

Aus der Klinik für Innere Medizin mit Schwerpunkt für Hämatologie und Onkologie
am Campus Virchow Klinikum der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Zur Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie mit dem selektiven bcr-abl Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib: Molekulare Verlaufskontrollen und Untersuchungen zur Resistenzentstehung

Zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von
Il-Kang Na

aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. B. Dörken
 2. Prof. Dr. med. C. Denzlinger
 3. PD Dr. med. habil. E. Schleyer

Datum der Promotion: 20.05.05

WIDMUNG

Meinen Eltern,
In-Soo Na und Young-Eu Na,
gewidmet

ABSTRACT

HINTERGRUND: Der selektive Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib inhibiert das Wachstum von bcr/abl positiven Zellen und stellt somit eine neue Therapieoption in der Behandlung der CML dar. Mittlerweile sind verschiedene Mutationen innerhalb der abl Sequenz beschrieben worden, die eine adäquate Imatinibbindung verhindern und zu einer zellulären Resistenz der CML Zellen führen.

METHODE: Wir untersuchten 69 Patienten unter Behandlung mit Imatinib im Rahmen von laufenden klinischen Studien. Bei Studieneinschluss waren 37 Patienten in chronischer Phase, 21 Patienten in akzelerierter Phase und 11 Patienten in Blastenkrise. Mittels Real-time PCR wurden bcr/abl, WT1, MDR1 und AGP RNA Traskripte aus peripheren Leukozyten quantifiziert. AGP Proteinlevel wurden turbidimetrisch bestimmt. Ausserdem entwickelten wir eine neue, hochsensitive Technik zur Detektion bekannter Mutationen innerhalb der bcr/abl Domäne, indem wir das DNA-Clamping mittels Peptidnukleinsäure (PNA) mit einem Hybridisationssonden-Assay kombinierten.

ERGEBNISSE: 1. Unsere Resultate bestätigen die hämatologische Effizienz von Imatinib in Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten. 2. Eine komplette molekulare Remission konnte bei einem Patienten erzielt werden. 3. Wir konnten die bcr/abl Mutationen Thr315Ile, Glu255Lys and Tyr253His mit hoher Sensivität nachweisen. In einem Falle konnte die Gly255Lys Mutation vor der Behandlung detektiert werden.

SCHLUSSFOLGERUNG: Bcr/abl und WT1 mRNA stellen in der Behandlung der CML Verlaufs- und Prognosemarker dar. Ein Zusammenhang zwischen MDR1 mRNA bzw. AGP mRNA und einer Resistenzentwicklung gegenüber Imatinib konnte nicht bestätigt werden.

Durch den PNA-Clamping Assay konnten präexistente und sich entwickelnde bcr/abl Mutationen mit ungünstiger Prognose sicher und frühzeitig detektiert werden. Diese Tatsache ermöglicht eventuell eine Risikostratifizierung der CML und könnte als Model zum individuellen molekularen Monitoring und zur therapeutischen Strategie in anderen malignen Erkrankungen dienen.

Schlagworte: CML, Imatinib, Resistenz, PNA

ABSTRACT

BACKGROUND: The selective tyrosine kinase inhibitor imatinib inhibits growth of bcr/abl positive cells and, thus, has become a novel therapeutic option for the treatment of Ph⁺ leukaemic patients. Various mutations within the abl sequence have been described that prevent adequate imatinib binding to bcr/abl resulting in cellular resistance of CML cells.

METHODS: We investigated 69 CML patients under treatment with imatinib as part of an ongoing clinical trial. At recruitment 37 patients were in chronic phase, 21 patients in accelerated phase and 11 patients in blast crisis. Bcr/abl, WT1, MDR1 and AGP RNA transcripts were quantified in peripheral leucocytes by real time PCR. AGP protein levels in plasma were measured by turbidimetric analysis.

By combining peptide nucleic acid (PNA) based DNA clamping with a fluorescence hybridisation probe assay we developed a new and highly sensitive technique for the detection of known mutations within the bcr/abl kinase domain.

RESULTS: 1. Our results demonstrate efficacy of imatinib on the haematological level in accordance with previously published data. 2. Complete molecular remission could be achieved in one patient. 3. We could effectively enhance the detection sensitivity (0,2%) for the BCR/ABL mutations Thr315Ile, Glu255Lys and Tyr253His. In one case the Gly255Lys mutation was detectable before treatment.

CONCLUSION: Bcr/abl and WT1 mRNA are predictive marker in the treatment of CML. Our investigation could not confirm any relation between MDR1 mRNA nor AGP mRNA and a resistance to imatinib. By the PNA clamping assay pre-existing and evolving bcr/abl mutations associated with an unfavorable prognosis could be safely detected. This may facilitate risk stratification in CML and may serve as a model for individualized molecular monitoring and therapeutic strategies in other malignant diseases.

Keywords: CML, imatinib, resistance, PNA

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I-III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	IV
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 DIE CHRONISCHE MYELOISCHE LEUKÄMIE (CML).....	1
1.1.1 Historie.....	1
1.1.2 Klinisches Erscheinungsbild der CML.....	1
1.1.3 Hämatologische und zytologische Charakteristika der CML.....	1
1.1.4 Pathomechanismus der CML.....	2
1.1.5 Das Philadelphia-Chromosom.....	3
1.2 DAS CHIMÄRE BCR-ABL PROTEIN.....	3
1.2.1 Mechanismen der BCR-ABL vermittelten Transformation.....	5
1.2.2 Diagnostik der CML.....	6
1.2.3 Bisherige Therapieoptionen bei der CML.....	6
1.2.4 Prognose der CML.....	7
1.3 ECHTZEITFLUORESCENZ-POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR).....	8
1.3.1 Das Prinzip der Methode.....	8
1.3.2 Das Prinzip der Taqman®-Hybridisierungssonden.....	8
1.3.3 Das Prinzip der HybProbe®-Hybridisierungssonden mittels Lightcycler®.....	10
1.3.4 DNA-Schmelzpunktanalysen.....	11
1.4 PEPTIDE NUCLEIC ACID (PNA)-ASSAY.....	13
1.5 DER BCR-ABL SPEZIFISCHE TYROSINKINASEINHIBITOR IMATINIB (STI 571).....	14
1.5.1 Imatinib – Struktur und Wirkungsmechanismus.....	14
1.5.2 Untersuchung zur Wirkung im zellfreien System.....	15
1.5.3 In vitro-Untersuchung zur Wirkung.....	15
1.5.4 In vivo-Untersuchung zur Wirkung.....	16
1.5.5 Klinische Studien mit Imatinib.....	16
1.6 RESISTENZMECHANISMEN GEGEN IMATINIB UND PROGNOTISCHE PARAMETER.....	19
1.6.1 Intrinsische Resistenzmechanismen.....	19
1.6.2 Extrinsische Resistenzmechanismen.....	23
1.6.3 Molekulare Verlaufs- und Prognoseparameter.....	25
2 FRAGESTELLUNG.....	27
3 PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN.....	28
3.1 PATIENTEN.....	28
3.1.1 Klinische Studien.....	28
3.1.2 Klinische Charakteristika des Studienkollektivs.....	30

3.2	REAGENTIEN, OLIGONUKLEOTIDE UND GERÄTE	32
3.2.1	Chemikalien, Enzyme, Kits und Rezepte	32
3.2.2	Synthetische Oligonukleotide	35
3.2.3	Technische Geräte	37
3.2.4	Hard- und Software.....	37
3.3	PROBENGEWINNUNG UND AUFARBEITUNG.....	37
3.3.1	Blutauarbeitung.....	37
3.3.2	Dextran-Separierung, Serum zur AGP Proteinspiegelbestimmung	38
3.3.3	RNS-Extraktion	38
3.3.4	Reverse Transkriptase.....	39
3.3.5	DNA-Konzentrationsbestimmung	40
3.4	KLONIEREN GENETISCHER FRAGMENTE	40
3.5	POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR).....	41
3.5.1	Konventionelle PCR.....	41
3.5.2	Echtzeitfluoreszenz-PCR.....	41
3.5.3	Generierung von Standardkurven.....	42
3.6	MUTATIONSANALYSE IM LIGHTCYCLER®.....	42
3.7	DNA-SEQUENZIERUNG.....	43
3.8	STATISTISCHE AUSWERTUNG	43
4	ERGEBNISSE.....	44
4.1	THERAPIEERGEBNISSE	44
4.1.1	Hämatologisches Ansprechen.....	45
4.1.2	Zytogenetisches Ansprechen	46
4.1.3	Nebenwirkungen.....	49
4.2	AGP SERUMSPIEGEL	51
4.3	ERGEBNISSE DER QUANTITATIVEN ECHZEIT-FLUORESCENZ-PCR.....	53
4.3.1	Darstellung von Standardkurven	53
4.3.2	bcr-abl mRNS Transkripte	55
4.3.3	AGP mRNS Transkripte.....	57
4.3.4	WT1 mRNS Transkripte.....	59
4.3.5	MDR1 mRNS Transkripte	61
4.4	ERGEBNISSE DES CLAMPING-PROBE ASSAYS.....	63
4.4.1	Methodenevaluation	63
4.4.2	Mutationsnachweis bei therapierefraktären und rezidierten Patienten	63
5	DISKUSSION	67
5.1	METHODENDISKUSSION	67
5.2	AUSWERTUNG UND VERGLEICH DER STUDIEN CSTI571-0113/ -0114/ -0115	70
5.2.1	Hämatologische und zytogenetische Daten der Studie CSTI571-0113.....	70
5.2.2	Hämatologische und zytogenetische Daten der Studie CSTI571-0114	71
5.2.3	Hämatologische und zytogenetische Daten der Studie CSTI571-0115.....	72

5.2.4	<i>Nebenwirkungen</i>	72
5.3	α_1 -SAURES-GLYKOPROTEIN (AGP): PROTEINCHEMISCHE UND MOLEKULARBIOLOGISCHE VERLÄUFE	73
5.4	DISKUSSION DER BCR-ABL, WT1 UND MDR1 MRNS DATEN	75
5.5	DISKUSSION DER DATEN DES PNA-CLAMPING ASSAYS	78
5.6	AUSBLICK	81
6	ZUSAMMENFASSUNG	83
7	LITERATUR	85

ANHANG

Danksagung

Erklärung

Publikationsliste

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABC	ATP-binding cassette	KM	Knochenmark
AGP/ α_1 sGP	α_1 -saures Glykoprotein	KMT	Knochenmarktransplantation
ALL	Akute lymphatische Leukämie	Lys	Lysin
ALT	Alanin-Aminotransferase	MDR	Multidrug resistance
AML	Akute myeloische Leukämie	MDS	Myelodysplastisches Syndrom
AraC	Arabinosylcytosin	Meth	Methionin
AST	Aspartat-Aminotransferase	MRD	Minimal residual disease
ATP	Adenosintriphosphat	mRNS	Messenger-Ribonukleinsäure Protein
CBL	Casitas B-lineage lymphoma-Protein	P	Protein
CCD	Charge – coupled device	PCR	Polymerase chain reaction
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	PDGF	Platelet derived growth factor
CML	Chronische myeloische Leukämie	Pgp	P-Glykoprotein
CPA	Clamping-Probe Assay	Ph	Philadelphia
CRKL	CRK like-Protein	PI-3	Phosphatidylinositol-3
C _t	Threshold cycle	PNA	Peptide nucleic acid
DNS	Desoxyribonukleinsäure	RAR α	Retinoic acid receptor alpha
FAK	Focal adhesion kinase	RNS	Ribonukleinsäure
FET	Fluoreszenz-Energietransfer	RT	Reverse Transkription
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung	SZT	Stammzelltransplantation
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer	SGOT (AST)	Serum Glutamin-Oxaloacetat Transaminase
FU	Fluorouracil	SGPT (ALT)	Serum Pyruvat-Oxaloacetat Transaminase
Glu	Glutamin	SHK	SRC homology 2-containing Protein
GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2	STAT	Signal transducer and activator of transcription
GvHD	Graft versus host disease	Thr	Threonin
GvL	Graft versus leukemia	TK	Tyrosinkinase
His	Histamin	ULN	Upper limit normal range
HHT	Homoharringtonine	Val	Valin
HLA	Human leukocyte antigen	WBC	White blood count
IFN α	Interferon alpha	WT1	Wilms-Tumor-Gen 1
JAK	Janus family kinase		
kD	Kilodaltons		

1 EINLEITUNG

1.1 DIE CHRONISCHE MYELOISCHE LEUKÄMIE (CML)

1.1.1 Historie

Die chronische myeloische Leukämie (CML) wurde erstmals 1845 von Virchow, Bennett und Craigie beschrieben [1, 2, 3]. Es handelt sich bei der CML um eine myeloproliferative Erkrankung, die von der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle ausgeht. Sie hat eine Inzidenz von 1-2 pro 100.000 und macht insgesamt 15% aller Leukämien bei Erwachsenen aus. Das mittlere Alter der Patienten bei Diagnosestellung beträgt 53 Jahre [4]. Als Risikofaktor gilt eine vorangegangene Strahlenbelastung.

1.1.2 Klinisches Erscheinungsbild der CML

Die CML wird unterteilt in drei Phasen: die chronische Phase, die akzelerierte Phase und die Blastenkrise. In der chronischen Phase der CML kann es zu einer Vielzahl von Symptomen kommen, in vielen Fällen ist sie jedoch symptomarm. Bei Erstdiagnose treten typischerweise Spleno- und Hepatomegalie, Abgeschlagenheit, Leistungsminderung, Inappetenz, Fieber, Nachtschweiß, Infektionen, Blutungsneigung und Priapismus auf.

Im Verlauf der Therapie kann es zur kompletten Regredienz dieser Symptome kommen, ihr erneutes Auftreten ist jedoch im Rahmen eines Krankheitsprogresses möglich. Todesursachen sind vor allem Infektionen und hämorrhagische Diathesen.

1.1.3 Hämatologische und zytologische Charakteristika der CML

Kennzeichnende Veränderungen im peripheren Blut in der chronischen Phase der CML sind eine Leukozytose, die >100.000 Zellen/µl betragen kann, sowie eine Linksverschiebung mit Auftreten von Blasten, Promyelozyten, Metamyelozyten und Myelozyten. Des Weiteren treten Basophilie, Eosinophilie und Anämien auf. Bei Erstdiagnose ist eine Thrombozytose typisch [5].

Im Knochenmark verschiebt sich das Verhältnis zwischen Granulopoese und Erythropoese von 3:1 bis gelegentlich 10:1. Es zeigt eine Hyperzellularität mit erhöhtem Anteil an Myeloblasten und Promyelozyten, später entwickelt sich eine

nochenmarksfibrose. Mit Fortschreiten der Krankheit sind für die akzelerierte Phase und Blastenkrise eine weitere Vermehrung der Blasten und Promyelozyten, ein Thrombozytenabfall, sowie eine zunehmende Anämie und Basophilie im Knochenmark und peripheren Blut typisch. Weitere Merkmale für die akzelerierte Phase können eine klonale Evolution des leukämischen Klons und eine persistierende (über vier Wochen andauernde) Splenomegalie sein [6, 7]. Unter klonaler Evolution versteht man das Auftreten zusätzlicher chromosomaler Aberrationen während der Evolution.

Neben einer Zunahme dieser Befunde, mit Präsenz von $\geq 30\%$ Knochenmarksblasten im peripheren Blut oder im Knochenmark [8], ist ein extramedullärer Befall (so genannte „Chlorome“), wie z.B. in seltenen Fällen ein leukämischer Tumor in der Lunge oder dem Skelett, kennzeichnend für die Blastenkrise. Tab. 1 listet die kennzeichnenden hämatologischen Parameter der einzelnen Phasen der CML auf. Eine international gültige Stadieneinteilung liegt bisher nicht vor.

Tabelle 1. Befunde der einzelnen Phasen der CML im peripheren Blut und Knochenmark.

	Chronische Phase	Akzelerierte Phase	Blastenkrise
Peripheres Blut:			
Blasten:	< 10 %	$\geq 10\% < 30\%$	> 30 %
Basophilie:	< 20 %	$\geq 20\%$	
Thrombozyten:	$\geq 100.000/\mu\text{l}$	< 100.000/ μl	
Knochenmark:			
Blasten:		$\geq 10\% < 30\%$	> 30 %
zusätzliche Merkmale:		Klonale Evolution des leukämischen Klons, persistierende Splenomegalie	Extramedullärer Befall

1.1.4 Pathomechanismus der CML

Das herausragende Charakteristikum der CML besteht in dem Auftreten des Philadelphia (Ph)-Chromosoms, das von Nowell et al. als erste zytogenetische Veränderung bei Malignomen entdeckt wurde [9].

1.1.5 Das Philadelphia-Chromosom

Das Ph-Chromosom ist bei 95% der CML Patienten zu finden. Es handelt sich dabei um eine reziproke, balancierte Translokation der langen Arme der Chromosomen 9 und 22 $t(9;22)(q34;q11)$ [10]. Das daraus resultierende verkürzte Chromosom 22 wird in seiner veränderten Form als Ph-Chromosom bezeichnet.

Bei einem geringen Anteil der Patienten (<5%) lässt sich das Ph-Chromosom mit zytogenetischen Methoden dennoch nicht nachweisen. Die biologische Relevanz dieser Konstellation ist unklar.

1.2 DAS CHIMÄRE BCR-ABL PROTEIN

Die molekulare Konsequenz aus der Translokation $t(9;22)(q34;q11)$ ist eine Fusion des abl-Onkogens mit variablen Sequenzen des Chromosoms 22, den „break point cluster regions (bcr)“. Es entsteht das bcr-abl Fusionstranskript, welches für das chimäre BCR-ABL Protein kodiert. Dieses Protein ist für die krankheitsspezifische Klinik der CML verantwortlich.

Die spezifischen Bruchstellen im abl-Gen und den variablen bcr-Sequenzen werden schematisch in Abb. 1a und 1b gezeigt. Die Transkription des Translokations-Gens resultiert, abhängig von der Bruchstelle im bcr, in drei unterschiedlich schweren Onkoproteinen mit differierendem Molekulargewicht [11].

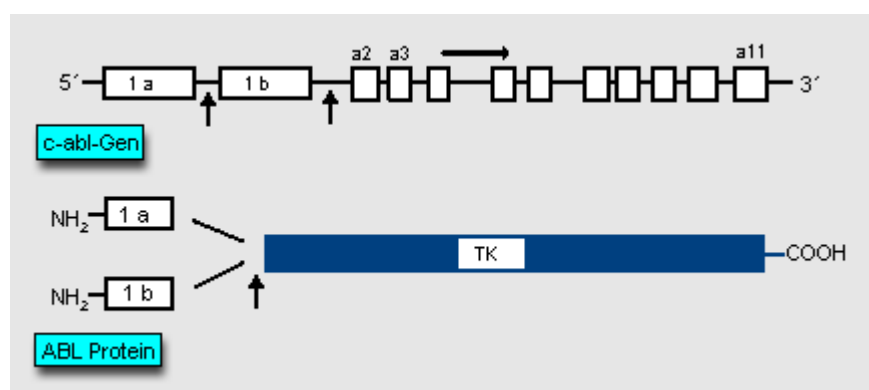


Abbildung 1a: abl-Gen und korrespondierendes ABL-Protein.

Schematisch gezeigt wird das abl-Gen, wie auch das dazu korrespondierende ABL-Protein. Die einzelnen Rechtecke repräsentieren die Exone. Pfeile (↑) kennzeichnen die Bruchstellen. Das abl-Gen besitzt zwei alternative Exone. TK steht für Abbildung 1: die kennzeichnende Tyrosinkinasedomäne. Die Länge der Fusionsproteine variiert mit der Größe der BCR-Sequenz. Die ABL-Sequenz ist in allen Fusionsproteinen konstant. (Abbildung modifiziert aus [141, 142]).

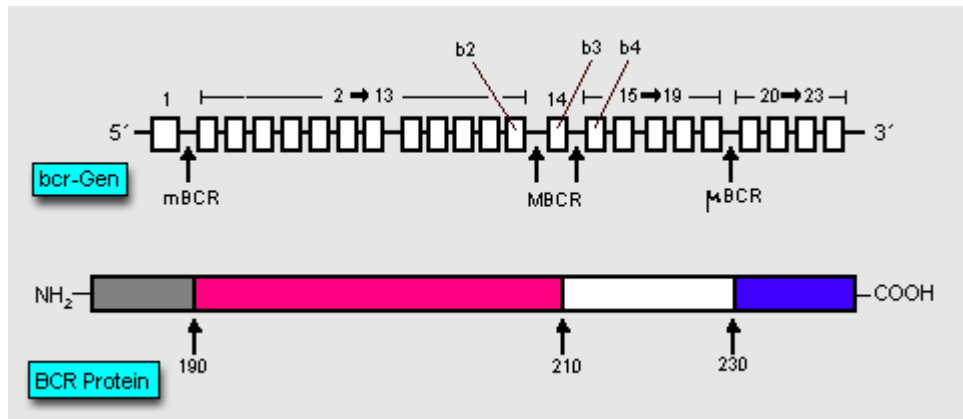


Abbildung 1b: bcr-Gen und korrespondierendes BCR-Protein.

Schematisch gezeigt wird das bcr-Gen, wie auch das dazu korrespondierende BCR-Protein. Die einzelnen Rechtecke repräsentieren die Exons. Pfeile (↑) kennzeichnen die Bruchpunkt-Clusterregionen (break point cluster regions: mBCR, MBCR und μBCR), welche in den 190-kD, 210-kD oder 230-kD Onkoproteine resultieren. M = major, m = minor und μ = micro (Abbildung modifiziert aus [141, 142]).

Das 210 kD schwere BCR-ABL Protein P210BCR-ABL entsteht nach Fusion mit der Major-bcr-Region (MBCR). Die Bruchstelle auf dem abl-Gen liegt zwischen den Introns 1a und 1b oder zwischen den Introns 1a und a2 (Abb. 1a). Auf dem bcr-Gen kommt es in der MBCR zum Bruch (Abb. 1b). Die Transkription dieses Fusionsgens resultiert in b2a2 und/ oder b3a2 mRNS, die beide ein P210BCR-ABL kodieren. In den meisten Fällen findet man in den CML-Zellen entweder b2a2 mRNS oder b3a2 mRNS, nur in 5% der Fälle kommen beide Transkripte zusammen vor. P210BCR-ABL tritt bei 95% der Patienten mit CML auf [12].

Das 190 kD schwere BCR-ABL Protein P190BCR-ABL, das nach Bruch in der minor-BCR-Region (mBCR) entsteht [13], wird bei der CML nur selten gefunden, tritt aber in 10% der Fälle einer akuten lymphatischen Leukämie bei Erwachsenen auf.

Die im Rahmen dieser Arbeit erfassten molekularbiologischen Daten bezüglich des bcr-abl Fusionstranskriptes konzentrieren sich ausschliesslich auf die mRNS, die das P210BCR-ABL kodiert.

Das BCR-ABL Protein P230BCR-ABL wird mit der seltenen Ph-positiven neutrophilen CML assoziiert [14].

1.2.1 Mechanismen der BCR-ABL vermittelten Transformation

C-abl, das zelluläre Homolog des transformierenden Proteins v-abl, welches in der murinen Abelson-Leukämie gefunden wurde, kodiert eine Tyrosinkinase. Das c-ABL-Protein hat eine streng regulierte Kinaseaktivität und ist sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma der Zelle aktiv. Das BCR-ABL Protein dagegen ist überwiegend im Zytoplasma lokalisiert und durch eine konstitutiv gesteigerte Tyrosinkinaseaktivität gekennzeichnet, welche eine essentielle Bedeutung für die Transformation der Zelle hat [15, 16, 17].

Andere Domänen des BCR-ABL Proteins dienen zur Bindung von Adapterproteinen, wie dem Protein GRB2, das am Wachstumsfaktor-Rezeptor CRKL, das dem CRK-Protein ähnelt [18, 19, 20], dem casitas B-Linien lymphoma protein (CBL) und dem SHK-Protein, das SRC Homologien beinhaltet [21]. Über diese Adapterproteine läuft die Aktivierung spezifischer Signaltransduktionswege über das BCR-ABL Protein.

Für die Transformation der BCR-ABL positiven Zellen spielen die Reaktionen über das Ras-Protein, die JAK/STAT-Kinasen und die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3) [22, 23, 24, 25] eine bedeutende Rolle. Somit wird die Inhibition der Apoptose der Aktivierung von Ras und PI-3 zugeschrieben [23, 24, 26].

P210BCR-ABL phosphoryliert und interagiert ausserdem mit Proteinen, die eine wichtige Rolle bei der zellulären Adhäsion und Zellmotilität spielen, wie z.B. Talin, Tensin, Paxillin, Actin, Vinculin und fokale Adhäsionskinase (FAK). Dadurch kommt es zu Adhäsionsdefekten und Abnormalitäten des Zytoskeletts, die für die BCR-ABL positiven Zellen charakteristisch sind [27].

Die exakte Abfolge der Reaktionen und die Wichtigkeit jedes einzelnen Reaktionsweges ist noch nicht geklärt [28]. Sicher ist jedoch, dass das BCR-ABL Protein Signalkaskaden aktiviert, die auch von bestimmten zytokinstimulierten Rezeptoren zur Regulation der normalen Hämatopoese genutzt werden.

Zusammenfassend ist die BCR-ABL positive Zelle durch eine gesteigerte proliferative Aktivität bzw. eine Hemmung der Apoptose gekennzeichnet, was zum leukämischen Phänotyp führt.

1.2.2 Diagnostik der CML

Die Diagnose der CML erfolgt durch körperliche Untersuchung, Blutbild, Laborchemie, Knochenmark (KM)-Aspiration, Biopsie und Molekularbiologie.

Das Differentialblutbild und auch das zytologische Bild zeigen krankheitsspezifische Verteilungen der Zellen, wie sie im Abschnitt 2.1.2 beschrieben sind. Im Rahmen der FISH-Technik kann mit Hilfe von bcr-abl spezifischen DNS-Sonden die typische Translokation t(9;22) in Interphasekernen detektiert werden.

Laborchemisch sind im Blut vor allem erhöhte Lactatdehydrogenase- und Harnsäure-Werte zu finden, während die alkalische Leukozytenphosphatase erniedrigt ist oder ganz fehlt.

Das KM-Aspirat wird verwendet für zytologische und zytogenetische Analysen, sowie Fluoreszenz-in situ-Hybridisationsanalysen (FISH) und Polymerase-Kettenreaktionen (PCR). Zur Beurteilung der KM-Zytogenetik erstellt man ein Karyogramm an Metaphasekernen, das neben der Translokation t(9;22) auch andere chromosomale Aberrationen darzustellen vermag.

1.2.3 Bisherige Therapieoptionen bei der CML

Im Prinzip unterscheidet man in der Behandlung der CML drei therapeutische Ziele:

1. Symptomkontrolle

Hämatologische Remissionen: Blutbildkontrolle

2. Zytogenetisches Ansprechen:

- komplett: definiert durch 0% Ph-positive Zellen im KM
- major: definiert durch 0-35% Ph-positive Zellen im KM
- partiell: definiert durch 1-35% Ph-positive Zellen im KM
- minor: definiert durch 36-65% Ph-positive Zellen im KM

3. Molekulare Remissionen: Bcr-abl Fusionstranskripte sind nicht nachweisbar.

Bis zur Einführung von Zytostatika gab es verschiedene Therapieansätze wie die Splenektomie, die Arsenbehandlung und schliesslich die Radiotherapie [29].

Die ersten zytostatischen Therapieoptionen bestanden in der Gabe von Busulfan und später Hydroxyurea. Busulfan, ein Alkylanz, das auf Stammzellebene wirkt, wurde

abgelöst von Hydroxyurea, einem zellzyklusspezifischen Ribonukleotidreduktase-inhibitor der DNS-Synthese, da in einer randomisierten, kontrollierten klinischen Studie gezeigt werden konnte, dass das mediane Überleben für Busulfan-behandelte Patienten kürzer war als das für Patienten, die mit Hydroxurea behandelt wurden [30].

In den 80er Jahren gewann Interferon- α (IFN α) immer mehr an Bedeutung. Mit Hilfe von IFN α konnte auch das zweite Therapieziel zytogenetischer Remissionen erreicht werden [31]. Es kam zu zytogenetischen Remissionen bei 20-30% der Patienten [32]. Die einzige im Rahmen von Studien erwiesene kurative Therapieoption bei CML ist die allogene Stammzelltransplantation. Aufgrund der therapiebedingten Mortalität und der limitierten Spenderverfügbarkeit kommen nur 15 - 20% der CML-Patienten für eine allogene Transplantation von verwandten Spendern mit identischen „Human Leucocyte Antigen“ (HLA) in Frage. Zieht man zusätzlich HLA-identische, nicht-verwandte Spender heran, erhöht sich die Zahl der mit Knochenmarkstransplantation (KMT) behandelbaren Patienten auf 30%. Die Durchführung einer KMT ist ausserdem durch ein zu hohes Alter des Patienten vor Therapiebeginn limitiert. Die 5-Jahres-Überlebensrate (krankheitsfrei) bei CML-Patienten in chronischer Phase nach allogener KMT liegt in den meisten Studien zwischen 50% und 60% [33, 34].

Die Indikationsstellung zu einer der oben erwähnten Therapieoptionen entscheidet sich anhand der etablierten Hasford- bzw. Gratwohl-Scores [35, 36].

1.2.4 Prognose der CML

Bei dem Hasford-Score handelt es sich um einen Prognosescore für eine IFN α -Therapie. Dieser setzt neben Alter, Milzgrösse und Blastenanteil im Blut, auch die Anzahl an Basophilen, Eosinophilen und Thrombozyten in Korrelation zum Langzeitüberleben unter Therapie.

Mit dem Gratwohl-Score lässt sich für jeden einzelnen Patienten ein Risikoscore für eine allogene Stammzelltransplantation errechnen. In diese Berechnung fliessen der Spendertyp, das Krankheitsstadium, das Alter des Patienten, die Geschlechterkombination von Spender und Patient und die Zeitdauer zwischen Diagnosestellung und Transplantation ein [35, 36]. Bei Patienten, die eine medikamentöse Therapie erhalten, ist die zytogenetische Remission ein sogenannter Surrogatmarker für ein verbessertes Langzeitüberleben [37].

1.3 ECHTZEITFLUORESZENZ-POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

1.3.1 Das Prinzip der Methode

Die quantitative Echtzeitfluoreszenz-PCR basiert auf einer Detektion von Fluoreszenzsignalen, welche im Verlauf der Amplifikation eines PCR-Produktes kontinuierlich erzeugt werden. Den entscheidenden Fortschritt dieses Systems im Vergleich zur konventionellen PCR stellt die Einführung von fluorogenen Sonden dar [38]. Das Fluoreszenzmonitoring während der Amplifikation basiert auf dem Prinzip, dass es zu einem Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (FRET) zwischen zwei benachbarten fluoreszenzmarkierten, sequenzspezifischen Oligonukleotiden kommt, die in einer bestimmten räumlichen Nähe zueinander an die Zielsequenz gebunden sind.

Diese Methode setzt einen fluoreszenzmarkierten Primer und eine fluoreszenzmarkierte Sonde voraus oder aber eine 3'-fluorochromtragende Sonde in Kombination mit einer 5'-fluorochromtragenden Sonde, die beide so konstruiert sind, dass sie auf demselben Strang zwischen einem Primerpaar an die DNA binden. Beide Primer tragen in diesem Falle keine Fluoreszenzfarbstoffe.

Bei der quantitativen Echtzeitfluoreszenz-PCR handelt es sich somit um eine automatisierte Prozedur, die es einfach und schnell ermöglicht, 96 Proben gleichzeitig zu messen. Die PCR-Produkte werden im geschlossenen Gefäß detektiert. Durch das Fehlen notwendiger post-PCR-Schritte wird die Kontaminationsgefahr gesenkt. Zudem kann durch die Generation von Standardkurven die absolute Templatmenge bestimmt werden. Die Quantifizierung der Gensequenz wird während der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion errechnet und nicht wie konventionell erst am Ende der PCR.

Eine gesteigerte Spezifität wird durch die Tatsache erzielt, dass drei Oligonukleotide (2 Primer und eine Sonde) spezifisch an die DNS binden. Insgesamt werden dadurch präzisere und zuverlässigere Ergebnisse erzielt.

1.3.2 Das Prinzip der Taqman®-Hybridisierungssonden

Das Prinzip der Signalentstehung mit TaqMan®-Hybridisierungssonden ist in Abb. 2 dargestellt. Ein Reporter-Fluorochrom (gewöhnlich 6-Carboxyfluorescein [6-FAM]) ist am 5'-Ende der DNS befestigt, und ein Quencher-Fluorochrom (z.B. 6-Carboxy-tetramethyl-Rhodamin [TAMRA]) ist an einer beliebigen T-Position oder am 3'-Ende angefügt. Zwischen Reporter und Quencher findet durch die räumliche Nähe ein

Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) statt, bei dem das Fluoreszenzsignal des Reporters unterdrückt wird.

Verlängert die *Thermophilus aquaticus* (Taq) DNA-Polymerase dann jedoch den Primer (Polymerisation), hydrolysiert die Polymerase die Sonde durch ihre intrinsische 5'-3'-Nukleaseaktivität. Der Abstand zwischen Quencher und Reporter verändert sich, so dass die Unterdrückung des Reporter-Fluoreszenzsignales wegfällt. Die Spezifität bleibt dadurch gewährleistet, dass nur gebundene Sonden von der Taq-Polymerase hydrolysiert werden und eine Extension gebundener Sonden, mittels Blockade des 3'-Endes durch einen Phosphatrest, verhindert wird.

Die Menge an Fluoreszenz, die während des Amplifikationszyklus freigesetzt wird, steht im Verhältnis zu der Menge an PCR-Produkten, die in jedem Zyklus gebildet wird.

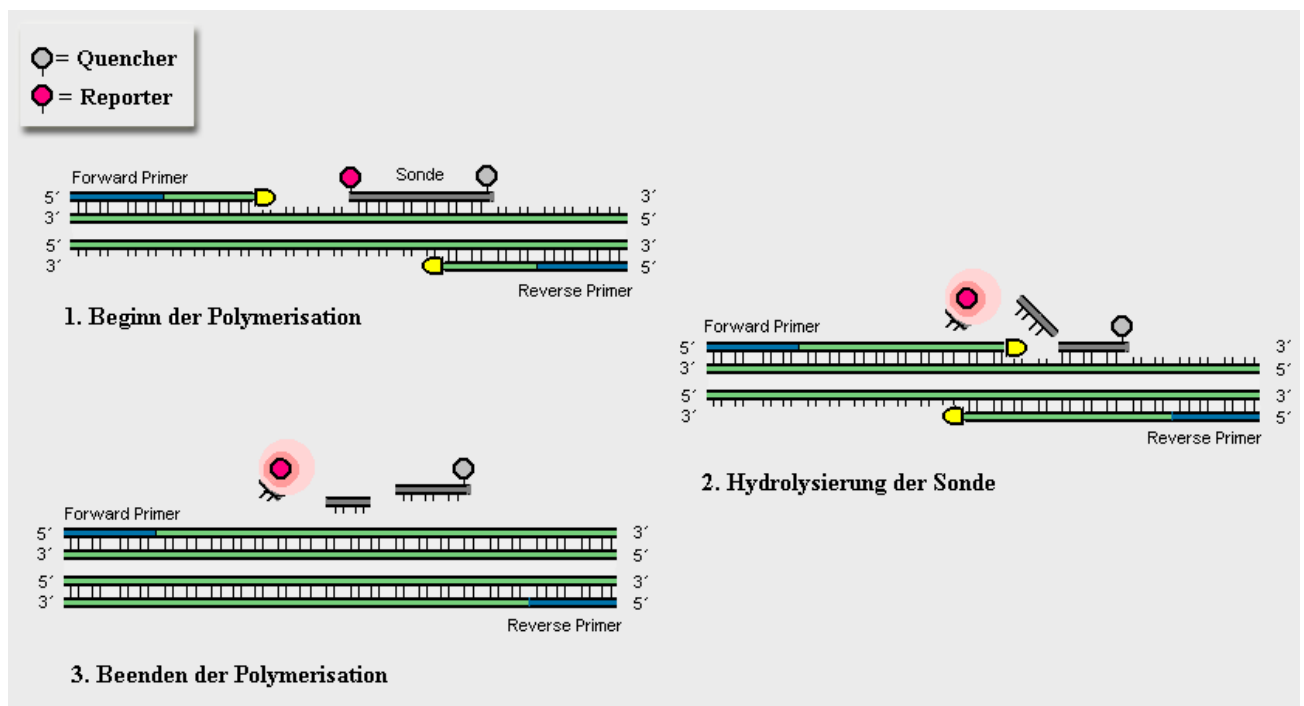


Abbildung 2: Prinzip der quantitativen Echtzeitfluoreszenz-PCR via TaqMan.

Die Taq-Polymerase hydrolysiert die Sonde durch ihre intrinsische 5'-3'-Nukleaseaktivität. Die räumliche Nähe, und damit der Fluoreszenz-Energietransfer, zwischen Reporter und Quencher wird auf diese Weise unterbrochen. Der Reporter emittiert nun ein Fluoreszenzsignal. Bei Reporter und Quencher handelt es sich um zwei verschiedene Fluorochrome.

Forward Primer, Reverse Primer und die Sonde sind spezifische Oligonukleotide (Roche Handbuch).

Zur Echtzeitfluoreszenz-Detektion der PCR dient das Abi Prism 7700 SDS-Detektionssystem. Es besteht aus einem 96 Reaktionsgefäße fassenden Thermocycler

mit optischem Heizdeckel, der sowohl mit einem Argonlaser (488nm) als auch mit einer charge-coupled device (CCD) Kamera – einem optischen System mit ladungsträgergekoppelter Schaltung – verbunden ist. Der Strahl des Lasers wird über einen dichroidischen Spiegel zu einem Multiplexer umgeleitet und von dort über Glasfasern und durch Linsen, die über jedem einzelnen Reaktionsgefäß positioniert sind, zu den Proben gesandt. Die Fluoreszenzemissionen des Reporterfarbstoffes werden durch dieselbe Faser über einen Spektrographen geleitet und zur CCD-Kamera geschickt, wo sie analysiert und in ein digitales Signal umgewandelt werden. Die Emissionen werden alle 7 Sekunden gemessen.

Die Sensitivität der Detektion ermöglicht die Messung der Daten noch während der exponentiellen Phase der PCR. Dabei wird der Zyklus bestimmt, bei dem die Emissionsintensität des Reporterfarbstoffes das Hintergrundrauschen übersteigt. Dieser wird als „threshold cycle (Ct)“ bezeichnet. Der Ct liegt mitten in der exponentiellen Phase der Reaktion und ist zuverlässiger als eine End-Punkt-Messung von angehäuften PCR-Produkten, wie es bei der herkömmlichen PCR-Methode der Fall ist.

Die quantitative Echtzeitfluoreszenz-PCR ist eine akkurate Methode zur Detektion spezifischer Gensequenzen mit hoher Sensitivität und Präzision. Dieses Detektionssystem ermöglicht eine Quantifizierung von DNS und RNS ohne arbeitsaufwändige „post-PCR“ Schritte. Das System ermöglicht die Detektion von spezifischen Gensequenzen innerhalb einer breiten Spannweite (mind. 5 Größenordnungen an Kopien-Zahlen).

1.3.3 Das Prinzip der HybProbe®-Hybridisierungssonden mittels Lightcycler®

Der LightCycler® ist ein Mikrovolumen-Fluorometer mit integriertem Thermocycler, das eine Schnellzyklus-DNS-Amplifikation infolge von sehr hohen Heiz- und Kühlraten mit einem Echtzeit-Monitoring der Fluoreszenz kombiniert [39].

Hier basiert das Fluoreszenzmonitoring während der Amplifikation auf dem Prinzip, dass ein Fluoreszenzsignal entsteht, wenn es zu einem Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (FRET) zwischen zwei fluoreszenzmarkierten, sequenzspezifischen Oligonukleotiden kommt, die nach der Hybridisierung auf demselben Strang benachbart gebunden vorliegen (Abb. 3) [40]. Der Donor-Fluoreszenzfarbstoff wird angeregt von einer Lichtquelle im LightCycler®. Ein Teil dieser Lichtenergie wird vom Donor- auf das

Akzeptorfluorochrom übertragen. Die dann emittierende Fluoreszenz wird gemessen und ist proportional zur Menge an spezifischen Zielsequenzen im Reaktionsmix.

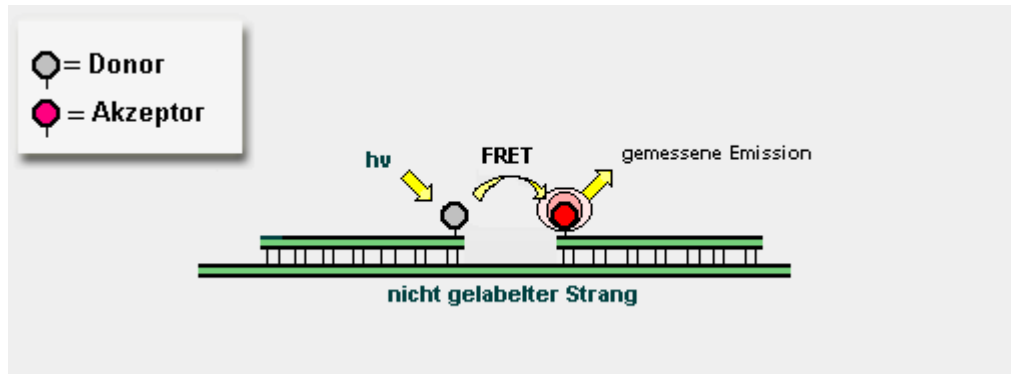


Abbildung 3: Energieübertragung im LightCycler®.

Im Gegensatz zur Real-time PCR via TaqMan® kommt es hier gerade nur dann zu Fluoreszenzemission, wenn sich Donor und Akzeptor in räumlicher Nähe befinden. Donor und Akzeptor stellen zwei verschiedene Fluorochrome dar. $h\nu$ ist die Lichtenergie, die den Donor anregt. Dadurch kommt es zu einem Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) [www.unizh.ch/ www.wikicmd2003/landt_2003.pdf].

Der Transfer der Resonanzenergie zwischen beiden Fluoreszenzen verstärkt sich durch Abkühlung, mit deren Hilfe Primer/Sonde oder Sonde1/Sonde2 an den DNS-Strang binden, und die Donor- und Akzeptorfluoreszenz in enge Nachbarschaft gebracht werden. Ein Erhöhen der Temperatur führt dann umgekehrt zum Lösen von Primer und Sonden, was einen Abbruch des Energietransfers zur Folge hat.

1.3.4 DNA-Schmelzpunktanalysen

Während in der Echtzeitfluoreszenz-PCR die Fluoreszenzmessung mit jedem Zyklus eine Schätzung über die Kopien-Zahl am Anfang ermöglicht und demnach eine quantitative Aussage gemacht werden kann, ist es möglich, im Anschluss an eine PCR durch Schmelzen – langsames Aufheizen von 45°C bis zu 85°C – eine qualitative Information über das Amplikon zu erzielen.

Diese Methode eignet sich zur Genotypisierung und Mutationsdetektion. Durch die unterschiedlichen Schmelztemperaturen der kurzen spezifischen Doppelstränge, wie es bei den fluoreszenzmarkierten Primern und Hybridisierungs sonden der Fall ist, ist es möglich, einzelne Basenveränderungen im Amplikon zu identifizieren (Abb. 4) [41, 42].

Im Rahmen einer Mutationsanalyse muss ein fluoreszenzmarkierter Primer nahe der Mutationsstelle positioniert sein und die Sonde den umschriebenen Mutationslokus überspannen. Arbeitet man mit zwei Hybridisierungs sonden, müssen diese so konzipiert sein, dass eine davon den umschriebenen Mutationslokus überspannt und die andere in enger Nachbarschaft zur ersten an den selben Strang bindet.

Die Schmelztemperatur (T_m) eines bestimmten Oligonukleotids (Primer bzw. Hybridisierungssonden) beschreibt die Temperatur, bei der 50% des Oligonukleotids nicht hybridisiert vorliegen. T_m wird abgeleitet vom Wendepunkt oder vom maximalen Amplitudenwert der 1. Ableitung einer Kurve in einem Diagramm, das die Fluoreszenz gegen die Temperatur abbildet. Sie ist für jedes Oligonukleotid charakteristisch und hängt von der Länge, dem G:C-Gehalt, der Sequenzreihenfolge und der Watson-Crick-Paarung ab [43]. Liegt ein „Basenpaar-Mismatch“ vor, vermindert sich die Stabilität der Bindung zwischen DNS und Oligonukleotiden. Die „Mismatch-Oligonukleotide“ lösen sich im Vergleich zu komplett komplementären Oligonukleotiden beim Schmelzen schon bei einer niedrigeren Temperatur und es kommt zu einer Verschiebung der Schmelzkurve. Die Richtung der Verschiebung hängt davon ab, ob man eine mutations- oder wildtypspezifische Sonde verwendet.

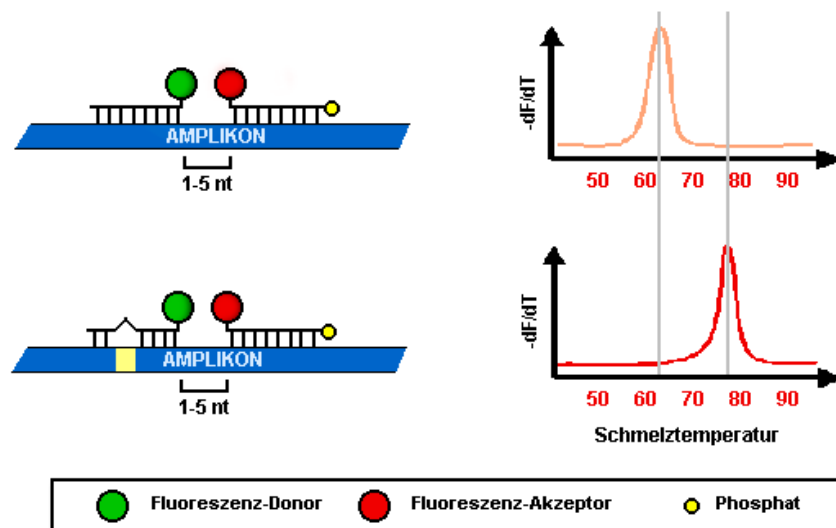


Abbildung 4: Mutationsanalyse durch Erstellen von Schmelzkurven.

Ein Mismatch oder Match zwischen Oligonukleotiden und spezifischer Gensequenz lässt sich durch eine Verschiebung in der ersten Ableitung der Schmelzkurve (dF/dt) unterscheiden. Spezifische Oligonukleotide, die 1-5 Nukleotide (nt) auseinander liegen, tragen den Fluoreszenz-Donor und den Fluoreszenz-Akzeptor [www.unizh.ch/www/wik/ md2003/landt_2003.pdf].

Hybridisierungssonden werden in der Humangenetik zur Detektion von Sequenzvariationen genutzt. So sind Mutationen im Faktor V (Resistenz gegen aktiviertes Protein C) [42], HFE (vererbte Hämatochromatose) [44] und CFTR (zystischer Fibrose) [45] mit Hilfe von Hybridisierungssonden detektiert worden.

1.4 PEPTIDE NUCLEIC ACID (PNA)-ASSAY

Der Peptide Nucleic Acid (PNA)-Assay kombiniert das PNA-vermittelte PCR-Clamping mit der Sequenz-sensitiven Identifikation durch Hybridisierungssonden.

Bei der PNA handelt es sich um eine DNS-Imitierung, bei der das für die DNS typische Phosphoribose-Rückgrat durch eine peptidähnliche Aneinanderreihung von (2-Aminoethyl)-Glycin-Einheiten ersetzt wird [46]. Dieser chemische Unterschied ist der Grund dafür, dass die PNA komplementären Sequenzen in einer Watson-Crick-Hydrogenbindung mit einer höheren thermalen Stabilität als die korrespondierenden Desoxyribonukleotide bindet [47, 48].

Bei nicht-komplemetärer Bindung auf Einzelbasenpaar-Ebene sind die PNA/DNS-Hybride instabiler als die korrespondierenden DNS/DNS-Hybride. Ausserdem kann die PNA nicht als Primer für die DNS-Polymerase fungieren und wird damit durch sie nicht verlängert. Der Gebrauch von PNA verbessert die Allel-spezifische PCR durch Unterdrückung der Amplifikation der Hintergrundvariante [49]. Eine spezifische PNA klammert an eine Zielsequenz, so dass deren Amplifikation während der PCR blockiert wird.

Thiede et al. und Behn et al. etablierten Assays, in denen sie Wildtyp-spezifische PNA und mutationsspezifische Primer benutzten [50, 51]. Eine Wildtyp-spezifische PNA vermindert demzufolge die Amplifikation des Wildtyps. Bei Kombination einer Wildtyp-spezifischen PNA mit einer mutationsspezifischen Hybridisierungssonde, wird das Fluoreszenzsignal des Wildtypproduktes durch die PNA unterdrückt und somit eine exakte Quantifizierung des mutierten Allels trotz Überschuss an Wildtyp-DNS im Hintergrund ermöglicht.

1.5 DER BCR-ABL SPEZIFISCHE TYROSINKINASEINHIBITOR IMATINIB (STI 571)

Mit zunehmender Kenntnis der Pathogenese der CML wurde versucht, spezifische Therapieverfahren zu entwickeln wie z.B. spezifische Antikörper gegen BCR-ABL. Dieser Versuch scheiterte aber genauso wie der Versuch, bcr-abl spezifische Antisense-Oligonukleotide zu benutzen.

Als dritte Möglichkeit stand theoretisch der Einsatz kleiner Moleküle zur Verfügung, die beispielsweise zu einer Hemmung spezifischer Signaltransduktionskaskaden führen könnten. In der Praxis war die Durchführung dieser Methode zu jener Zeit jedoch nicht möglich.

1996 beschrieben Druker et al. zum erstenmal die Hemmung der Abl-Tyrosinkinase durch einen selektiven Inhibitor [52].

1.5.1 Imatinib – Struktur und Wirkungsmechanismus

Das 2-Phenylaminopyrimidinderivat Imatinib ($C_{30}H_{35}N_7SO_4$, früher benannt als CGP57148B oder STI571, auch bekannt als Glivec®) ist ein potenter Inhibitor der BCR-ABL Tyrosinkinase. Imatinib hat ein Molekulargewicht von ~590 kD und hemmt relativ spezifisch die Proliferation v-abl- und bcr-abl exprimierender Zellen. Der Wirkungsmechanismus dieses Inhibitors besteht in der selektiven und kompetitiven Hemmung sowohl der c-Abl als auch der BCR-ABL Tyrosinkinase durch Verhindern der Bindung des Adenosintriphosphats (Abb. 5). Auf molekularer Ebene kommt es hierbei zur Hemmung der Autophosphorylierung [53].

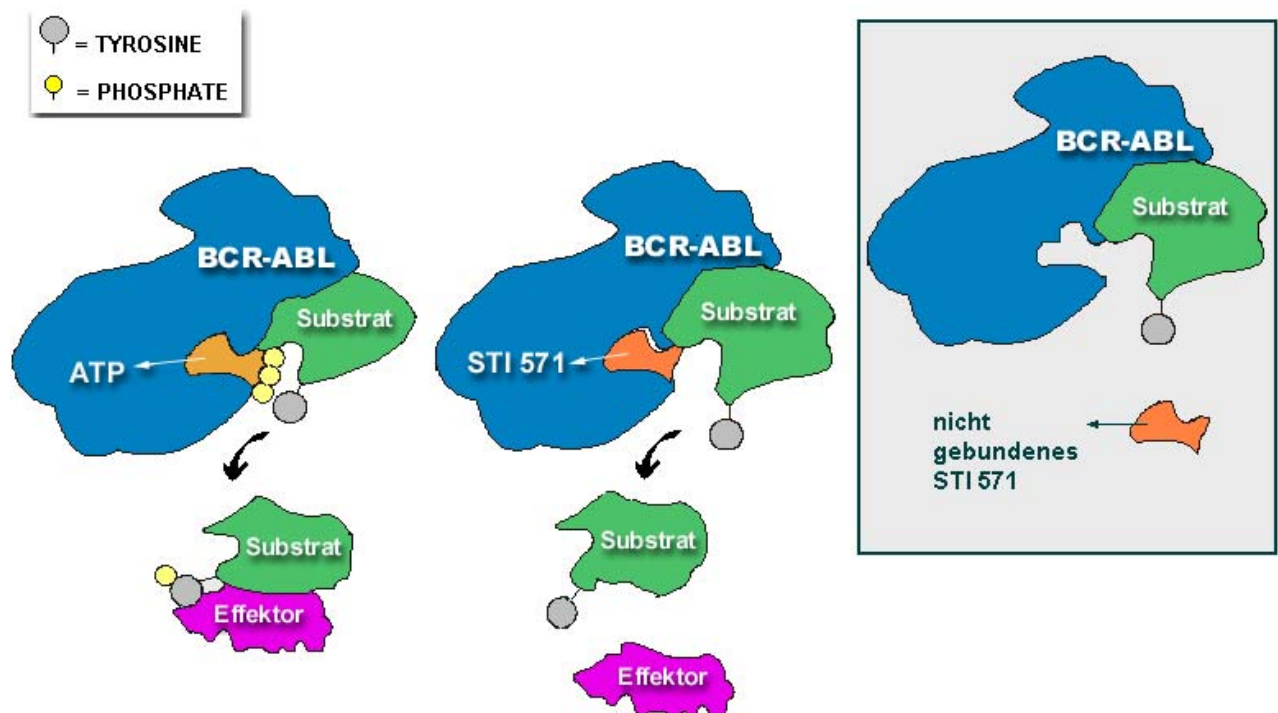


Abbildung 5: Schema der Struktur des Wirkungsmechanismus von Imatinib (STI 571).

Imatinib blockiert die Adenosintriphosphatbindungsstelle und hemmt somit kompetitiv sowohl die ABL- als auch BCR-ABL Tyrosinkinase [aus dem Editorial, NEJM, 2001, 344, April 5, S. 1084].

1.5.2 Untersuchung zur Wirkung im zellfreien System

Imatinib hemmte die Substratphosphorylierung der v-Abl-Tyrosinkinase um 50% mit einer Konzentration (IC_{50}) von $0,038\mu M$ und die der BCR-ABL und c-Abl-Tyrosinkinase mit einer Konzentration (IC_{50}) von $0,025\mu M$. Bei anderen Proteintyrosinkinasen und Serin-/Threoninkinasen, wie z. B. Proteinkinase A und C, Phosphorylasekinase und Caseinkinasen kam es zu keiner signifikanten Hemmung (IC_{50} -Wert >100). Lediglich der platelet derived growth factor (PDGF)-Rezeptor und c-kit wiesen eine ähnliche Hemmungssensibilität gegenüber Imatinib wie c-Abl oder BCR-ABL auf [52, 54].

1.5.3 In vitro-Untersuchung zur Wirkung

Ausgehend von diesen zellfreien Untersuchungen zeigte Imatinib in vitro in Zelllinien eine Hemmung der Autophosphorylierung von BCR-ABL und c-Abl mit einer IC_{50} von $0,25\mu M$. Die Selektivität von Imatinib in intakten Zellen zeigte sich durch einen proliferationshemmenden Effekt auf v-abl-transformierte PB-3c Zellen mit einer IC_{50}

von 0,1µM [55]. Diese ersten Ergebnisse wurden ergänzt durch die Feststellung einer spezifischen Hemmung der proliferativen Aktivität bei bcr-abl transformierten Zellen [52].

Weitere Experimente zeigten, dass durch den Tyrosinkinaseinhibitor eine Proliferation von BCR-ABL positiven, humanen (KCL22, BV173, K562, KU812, LAMA84 und MC3) und BCR-ABL negativen, nicht humanen Zelllinien (Daudi, NB4, NB4.306, U937, KG1 und DHL1) und Stammzellen von CML-Patienten anhaltend gehemmt werden konnte, ohne Kontrollzellen zu beeinflussen. Durch Westernblot-Experimente wurde eine Phosphorylierungshemmung bestätigt und mit durchflußzytometrischen Untersuchungen erwiesen, dass Imatinib zu einer Induktion der Apoptose führt [56].

1.5.4 In vivo-Untersuchung zur Wirkung

Druker et al. zeigten weiterhin die Effektivität Imatinibs an syngeneten C3H/HEJ-Mäusen, die mit BCR-ABL exprimierenden Zellen inokuliert wurden [52]. Bei diesen Versuchen konnte zunächst eine konzentrationsabhängige Hemmung des Tumorstwachstums – im Vergleich zu Kontrolltieren – gezeigt werden, die jedoch nicht zur kompletten Tumorzelleradikation führte. Eine 100%ige Tumoreradikation wurde bei nu/nu-Mäusen, T-Zellen defizienten Mäusen, nach oraler Gabe von Imatinib alle 8h über 11 Tage erreicht. Diesen Mäusen wurden vorher bcr-abl positive Zellen subkutan inokuliert, die daraufhin als solider bcr-abl positiver Tumor wuchsen. Es bestand ein Zusammenhang zwischen steigender initialer Tumormasse und abnehmender Effektivität der Wirkung des Imatinib [57].

1.5.5 Klinische Studien mit Imatinib

Aufgrund der vielversprechenden experimentellen Ergebnisse wurden 1998 die ersten klinischen Phase I -Studien durchgeführt. Druker et al. 2001 rekrutierte 83 Patienten in chronischer Phase in eine Phase I- Studie, die auf eine IFN α -haltige Therapie nicht mehr ansprachen [58].

Die Patienten wurden in 14 Dosiskohorten von 25-1000mg Imatinib, oral, 1x/d eingeteilt. Die Nebenwirkungen waren gering. Am häufigsten traten Nausea, Myalgien, Ödeme, besonders Periorbitalödeme, und Diarrhoen auf. Ein hämatologisches Ansprechen im Sinne einer Reduktion leukämischer Zellen im peripheren Blut zeigte sich bei allen

Patienten, die >140mg/d Imatinib erhielten. Bei Dosen >300mg zeigten 53/54 Patienten (98%) ein komplettes hämatologisches Ansprechen mit Normalisierung des peripheren Blutbildes. Von diesen 54 Patienten, die 300mg und mehr Imatinib bekamen, hatten 29 (53%) ein zytogenetisches Ansprechen, darunter waren 7 Patienten mit kompletter zytogenetischer Remission.

Zur Beurteilung der Aktivität von Imatinib bei CML in Blastenkrise und Ph-positiver Akuter Lymphozytärer Leukämie (ALL) wurden 58 Patienten in eine Pilotstudie mit Dosisescalation eingeschlossen [59]. Während dieser Studie traten infolge der Progredienz der Krankheit 16 Todesfälle auf. Kein Todesfall wird im Zusammenhang mit der Imatinib-Gabe gesehen. Hauptnebenwirkungen waren Übelkeit, Erbrechen und Ödembildung. Der Anteil peripherer Blasten nahm innerhalb der ersten Woche nach Beginn der Therapie bei 79% der Patienten ab.

Zur Prüfung von Wirksamkeit des Imatinib gab es zentrale Phase II-Studien, die man als Studie CSTI571-0113, Studie CSTI571-0114 und CSTI571-0115 bezeichnet.

In Studie CSTI571-0113 wurden 532 Patienten in chronischer Phase rekrutiert, bei denen eine Therapie mit IFN α gescheitert war. Verabreicht wurde eine tägliche orale Dosis von 400 mg Imatinib. Von den 454 Patienten mit bestätigter Diagnose einer CML in chronischer Phase zeigten 60% ein Major-zytogenetisches Ansprechen und 95% ein komplettes hämatologisches Ansprechen. Nach 18 Monaten war die CML in 89% der Patienten nicht in eine akzelerierte Phase oder Blastenkrise fortgeschritten und 95% der Patienten lebten noch. Nicht hämatologische Nebenwirkungen entsprachen denen der Phase I-Studie. Hämatologische Nebenwirkungen waren Neutropenien (35,1%), Leukopenien (23,7%), Anämien (7,7%) und Thrombozytopenien (19,9%) [60].

In einer zweiten Phase II -Studie (CSTI571-0114) wurden 181 Patienten mit akzelerierter Phase rekrutiert. Die Patienten wurden täglich mit 400 oder 600 mg Imatinib behandelt. Ein hämatologisches Ansprechen war bei 82% der Patienten zu verzeichnen, wobei es sich in 34% der Patienten um ein komplettes Ansprechen handelte. Die Rate des Major-zytogenetischen Ansprechens betrug 24% und die des kompletten 17%. Nebenwirkungen waren vergleichbar mit denen in der Studie der chronischen Phase-Patienten. Eine tägliche Dosis von 600 mg war im Vergleich zu einer täglichen Dosis von 400 mg noch effektiver. Dabei lag die Rate des zytogenetischen Ansprechens vergleichsweise höher (28% statt 16%), die Dauer des

Ansprechens war verlängert (79% statt 57% nach 12 Monaten), und die Überlebensrate (78% statt 65% nach 12 Monaten) war ebenso gestiegen [61].

In einer dritten Studie (CSTI571-0115) wurden 229 Patienten mit CML in Blastenkrise untersucht. Verabreicht wurde eine tägliche orale Dosis von 600 mg Imatinib. 52% der Patienten zeigten ein hämatologisches Ansprechen, das bei 31% der Patienten mindestens vier Wochen andauerte und bei davon 8% komplett war. 16% der Patienten zeigten ein major-zytogenentisches Ansprechen, davon 7% ein komplettes zytogenetisches Ansprechen. Nebenwirkungen sind bei 47 Patienten (18%) berichtet worden, wobei es sich hierbei meist um hämatologische Toxizitäten handelte, wie Neutropenie oder Thrombozytopenie. Bei 5% der Patienten kam es zum Abbruch der Therapie mit Imatinib meist aufgrund von Zytopenie, dermatologischen Toxizitäten und gastrointestinalen Reaktionen. Die mittlere Überlebenszeit lag bei 6,9 Monaten [62].

Die primäre Monotherapie mit Imatinib in neu diagnostizierter CML wird in einer multizentrischen, randomisierten Phase III -Studie mit der Standardtherapie, bestehend aus IFN α und Arabinosylcytosin (AraC) verglichen. 553 Patienten wurden mit Imatinib und 553 Patienten mit einer Kombination aus IFN α und AraC behandelt. Es gab die Möglichkeit eines Crossovers von einem Therapiearm in den anderen bei inadäquatem Ansprechen. Bislang wechselten 318 Patienten (57,5%) von einer IFN α -Kombinationstherapie zu einer Behandlung mit Imatinib. Demgegenüber tauschten nur 11 Patienten (2,0%) vom Imatinib-Arm zum IFN α -Arm. Primäres Studienziel stellte die Evaluierung des hämatologischen und zytogenetischen Ansprechens (Tab. 2), der Progressionsraten und der Nebenwirkungen dar [63].

Tabelle 2. Hämatologische und zytogenetische Ansprechraten unter Therapie mit Imatinib und IFN+AraC nach einem mittleren Follow-up von 19 Monaten [63]. 95%-Konfidenzintervall in runden Klammern. Definitionen des zytogenetischen Ansprechens: siehe Abschnitt 2.1.4.

Therapieschema (n=Anzahl der Patienten)	Imatinib (553)	IFN α +Ara C (553)
Komplettes hämatologisches Ansprechen [%]:	95,3 (93,2-96,9)	55,5 (51,3-59,7)
Zytogenetisches Ansprechen [%]:		
Major [%]	85,2 (81,9-88,0)	22,1 (18,7-25,8)
Komplett [%]	73,8 (69,9-77,4)	8,5 (6,3-11,1)
Partiell [%]	11,4 (8,9-14,3)	13,6 (10,8-16,7)

Imatinib induzierte bei Patienten, die von der Kombinationstherapie IFN α -AraC wechselten, ein komplettes hämatologisches Ansprechen bei 82,4% und ein komplettes zytogenetisches Ansprechen bei 39,6% [63].

1.6 RESISTENZMECHANISMEN GEGEN IMATINIB UND PROGNOSTISCHE PARAMETER

Bereits vor der Therapiemöglichkeit mit Imatinib konnte gezeigt werden, dass es im Krankheitsprogress von CML gehäuft zum Auftreten zusätzlicher chromosomaler Veränderungen kommt, die letztendlich durch die genetische Instabilität der bcr-abl positiven Zellen erklärt werden kann.

Verändert sich der leukämische Klon in solcher Weise, dass das Therapeutikum nicht mehr wirksam ist, spricht man von einem Resistenzmechanismus intrinsischer Art. Diese Zellen sind dann auch ex vivo resistent. Von den intrinsischen Resistenzmechanismen sind die extrinsischen Resistenzmechanismen zu unterscheiden. Im Rahmen extrinsischer Resistenzmechanismen bleibt die Sensitivität der Zielzelle unbeeinflusst, sie weist eine ex vivo-Resistenz auf. Ein gutes Beispiel wäre in diesem Falle eine Induktion von spezifischen Antikörpern oder Enzymen wie auch eine erhöhte Plasma-Eiweissbindung.

Mit der Entwicklung Imatinib-resistenter bcr-abl positiver Zelllinien fokussierten aktuelle Arbeiten das Thema der Resistenzentstehung gegenüber Imatinib. Im Falle von Imatinib werden Genamplifikation, eine Expression des Multidrug-Resistance-Proteins (MDR1), das als Drug-Effluxpumpe funktioniert, Mutationen und klonale Evolution als intrinsische Resistenzmechanismen und das Plasmaprotein α 1-saures Glykoprotein (AGP) als extrinsischer Resistenzmechanismus diskutiert.

1.6.1 Intrinsische Resistenzmechanismen

1.6.1.1 Amplifikation des bcr-abl Gens

Die Amplifikation des bcr-abl Gens ist der erste beschriebene Resistenzmechanismus gegenüber Imatinib. Die erste Zelllinie, die gegenüber Imatinib als resistent beschrieben wurde, war die humane Zelllinie LAMA84 R, die ursprünglich von einem CML-Patienten in Blastenkrise stammt. Durch Inkubation der bcr-abl positiven LAMA84-Zelllinie mit langsam steigender Konzentration an Imatinib entstand nach 7 Monaten LAMA84 R, die auch bei Konzentrationen von 3 μ M Imatinib noch proliferierte. LAMA84 R unterschied

sich von der nicht resistenten LAMA84 durch eine signifikante Reduktion der apoptotischen Zellen und durch vierfach erhöhte Expression des BCR-ABL Fusionsproteins [64].

Zytogenetischen Untersuchungen zeigten dann in Zelllinien, dass die Überexpression des BCR-ABL Fusionsproteins auf eine Amplifikation des bcr-abl Fusionstranskriptes zurückzuführen ist [64, 65, 66]. Die klinische Relevanz dieses Resistenzmechanismus wurde später von Gorre et al. beschrieben, die bei Imatinib-behandelten Patienten im Rezidiv eine bcr-abl Genamplifikation nachweisen konnten [67, 68].

1.6.1.2 Multidrug Resistance 1 (MDR1) Protein

Das MDR1 Gen kodiert das P-Glykoprotein (Pgp, Synonym: MDR1 Protein) [69]. Es handelt sich um ein 170 kd-Protein, das transmembranös lokalisiert ist. Beim MDR1 Proteinmolekül handelt es sich um eine hydrophobe, porenähnliche Struktur [70]. Das MDR1 Protein bindet und transportiert neutrale oder positiv geladene, hydrophobe Verbindungen. Die biologische Funktion des Proteins ist jedoch nicht bekannt. Es wird in einigen normalen Geweben z.B. der Nebennierenrinde, den proximalen renalen Tubuli und den intrahepatischen Gallengängen, vor allem aber auch in zytologisch-resistenten malignen Zellen exprimiert [71].

In Zytostatika-resistenten Zellen agiert das MDR1 Protein als Drug-Efflux-Pumpe. Die Fähigkeit, verschiedene Medikamente aus der Zelle zu exportieren bevor sie ihre kritische zytotoxische Konzentration erreicht haben, ist auf die Hydrolyseaktivität des MDR1 Proteins und der damit verbundenen Transportfähigkeit zurückzuführen [72]. Dieses Schema einer Effluxpumpe wurde durch Sequenzanalysen [73] und durch Transfektionsversuche in verschiedenen Typen von Zellen bestätigt [74, 75, 76].

Resistenz durch MDR1 Proteinüberexpression ist z.B. beim myelodysplastischen Syndrom (MDS) und der akuten myeloischen Leukämie (AML) beschrieben worden [77, 78, 79, 80, 81]. Klinische Daten zeigten, dass eine MDR1 Proteinüberexpression bei AML mit einer schlechten Prognose einhergeht [81, 82]. Bei CML-Patienten in Blastenkrise wurde in mehreren Studien ebenfalls eine gesteigerte MDR1 Proteinexpression detektiert werden [83, 84, 85, 86].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der MDR1 RNS-Gehalt im Krankheitsverlauf von CML-Patienten unter Imatinib-Therapie untersucht, um die Bedeutung des MDR1 Proteins als Resistenzmechanismus gegenüber Imatinib zu prüfen.

1.6.1.3 bcr-abl Genmutation

Das Auftreten von Punktmutationen an unterschiedlichen Lokalisationen in der Tyrosinkinasedomäne stellt den bedeutensten Mechanismus intrinsischer Resistenz dar. Gleichzeitig erweist sich, dass das Auftreten von Punktmutationen die wichtigste klinische Relevanz hat.

Gorre et al. beschreiben als erste Punktmutationen in bcr-abl positiven Zellen von Patienten, die zu einer intrinsischen Resistenz gegenüber Imatinib führten [67]. Ein Aminosäurenaustausch (T315I-Mutation, Austausch von Threonin gegen Isoleucin) in der 579-Basenpaarregion, die die ATP-Bindungsstelle und die Aktivierungsschleife der Kinasedomäne des BCR-ABL Proteins bildet, führt zu einer sterischen Veränderung der Imatinib-Bindungsstelle, die die Bindung von Imatinib verhindert. In Tab. 3 sind weitere Mutationen aufgelistet, die von verschiedenen Forschungsgruppen im Laufe der Zeit identifiziert wurden und sich entweder im Bereich der Bindungsstelle oder des Aktivierungsloops befinden. Die häufigsten Mutationen betreffen die Aminosäuren E255 und T315. In Position 255 wird Glutamin durch Lysin (E255L) oder Valin (E255V) ersetzt.

Tabelle 3. bcr-abl – Genmutationen, die bereits beschrieben und lokalisiert worden sind.

Mutation	Position der Mutation
M244V [87]	
G250E [88]	Nukleotidbindungsloop
Q252H [87]	Nukleotidbindungsloop
Q252R [87]	Nukleotidbindungsloop
Y253H [89]	Nukleotidbindungsloop
Y253F [90]	Nukleotidbindungsloop
E255K [91]	Nukleotidbindungsloop
E255V [68]	Nukleotidbindungsloop
V289A [92]	Imatinib-Bindungsstelle
F311T [93]	
T315I [67]	Imatinib-Bindungsstelle
F317L [88]	Imatinib-Bindungsstelle
M343T [87]	
M351T [88]	C-terminaler Bereich
E355G [87]	C-terminaler Bereich
F359V [87]	Imatinib-Bindungsstelle
V379I [87]	C-terminaler Bereich
F382L [87]	
L387M [87]	
H396P [89]	Aktivierungsloop
H396R [87]	Aktivierungsloop
F486S [94]	C-terminaler Bereich

1.6.1.4 Klonale Evolution

Neben der Einteilung in intrinsische und extrinsische Resistenzmechanismen muss für einen erfolgreichen Therapieansatz auch zwischen einem BCR-ABL abhängigen und einem BCR-ABL unabhängigen Resistenzmechanismen unterschieden werden. Die Akkumulation zusätzlicher chromosomaler Aberrationen neben dem Ph-Chromosom wird als klonale Evolution bezeichnet. Chromosomale Aberrationen wie z.B. Trisomie 8 und Veränderungen der Chromosomen 7 und 9 (Mutationen oder Deletionen in p53 und p16 [95] treten in der Akzelerationsphase typischerweise auf. Eine klonale Evolution des leukämischen Klon führt durch weitere chromosomale Veränderungen in den Zellen dazu, dass die Bedeutung des BCR-ABL Protein als Pathomechanismus verloren geht.

Der Progress der Krankheit hängt dann nicht mehr primär von BCR-ABL ab, sondern nimmt seinen Verlauf als Konsequenz anderer sekundärer, onkogener Veränderungen in der Zelle.

1.6.2 Extrinsische Resistenzmechanismen

1.6.2.1 α_1 -saures-Glykoprotein (α_1 sGP, AGP)

Im Rahmen von in vivo-Untersuchungen an Nacktmäusen, die mit BCR-ABL positiven Zelllinien inokuliert wurden, konnte im Anschluss an eine orale Therapie mit Imatinib die Entstehung resistenter Tumore beobachtet werden [64, 65].

Die in den in vivo-Experimenten aufgetretene Resistenz gegenüber Imatinib stellte sich nicht als zellulär vermittelt dar, sondern vielmehr durch den Organismus der Mäuse vermittelt dar [96]. Eine derartige Resistenz könnte beispielsweise durch die Induktion neutralisierender Antikörper gegen Imatinib oder aber auch durch eine gesteigerte Plasmaproteinbindung des Tyrosinkinaseinhibitors zustande kommen. Dementsprechend wurden gezielt in Frage kommende Plasmaproteine hinsichtlich ihrer Bindungsaffinität geprüft, und das hepatisch sezernierte AGP identifiziert.

Das humane AGP, auch als Orosomukoid bezeichnet, ist ein stabiles Plasmaprotein, das hauptsächlich in der Leber synthetisiert wird. Als einzelkettiges Glykoprotein hat es in nativer Form ein Molekulargewicht von 40 kD. Während Albumin, ein in der Leber synthetisiertes, globuläres Protein, eher für die Plasmabindung von sauren Substanzen verantwortlich ist, bindet AGP eher basische und neutrale Substanzen. Mit

unterschiedlicher Affinität ist AGP in der Lage, eine Bandbreite verschiedener Substanzen, von Steroiden über Antibiotika bis hin zu Antidepressiva zu binden [97]. Der Plasmaspiegel variiert sehr stark in Abhängigkeit zu verschiedenen physiologischen und pathologischen Bedingungen.

AGP gehört, wie auch das C-reaktive Protein, zu den sogenannten Akute-Phase-Proteinen. Der Plasmaspiegel steigt z.B. als Konsequenz von akuten Infektionen oder Entzündungen und ist erhöht bei Schwangerschaft, nach Myokardinfarkt, bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (z.B. Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn) sowie bei Patienten mit Tumorleiden oder bei hämatologischen Malignitäten [98]. Ganz et al. demonstrierten auch einige Fälle von CML-Patienten in Blastenkrise, die einen erhöhten Plasmaspiegel an AGP aufwiesen. Genauere Daten über eine Korrelation zwischen klinischen Stadien der CML und der stadienabhängigen Expression von AGP liegen bis dato allerdings nicht vor.

Nach der Entstehung einer intrinsischen Resistenz gegenüber Imatinib auf in vitro-Ebene in LAMA84-Zellen [64] wurden bei Mäusen mit rezidierten Tumoren nach Schnitteinzision des subkutan gelegenen Tumors bcr-abl positive Zellen entnommen und hinsichtlich ihrer Sensibilität gegenüber Imatinib untersucht. Interessanterweise zeigte sich im Rahmen dieser Untersuchung kein Unterschied der IC₅₀ im Vergleich zur parenteralen KU812-Zelllinie. Die resistenten Tiere zeigten im Vergleich zu Kontrolltieren trotz oraler Gabe von Imatinib keine Imatinib-vermittelte Inhibition der Phosphorylierung in ihren Tumorzellen. Diese Ergebnisse wiesen auf eine in vivo-Resistenz hin, die nicht zellulär, sondern vielmehr durch den Organismus selbst verursacht wurde. Auf der Suche nach einer nicht zellulär-vermittelten, sondern einer vielmehr humoralen Resistenz, zeigten Experimente eine signifikante Hemmung der Imatinib-Aktivität durch Bindung an AGP. Nach einer Ko-Inkubation der bcr-abl positiven KU812-Zellen mit AGP (2,0mg/ml) erfolgte ein Anstieg der IC₅₀ von initial 0,05 μ M auf über 3,0 μ M. Dieser Anstieg der IC₅₀ könnte mit einer Senkung des freien wirksamen Plasmaanteils von Imatinib vereinbar sein. Ein vergleichbares Resultat mit Albumin anstelle von AGP konnte jedoch nicht erzielt werden.

Unter der Fragestellung, ob in Nacktmäusen das Serumprotein AGP durch bcr-abl positive Zellinokulation oder durch Gabe von Imatinib induziert wird, wurden Versuchstiere entweder mit KU812-Zellen inokuliert oder, ohne vorherige Tumorzellinokulation, mit Imatinib behandelt. Anschliessend wurde in einem single

radial immunodiffusion test (SRID) die AGP Plasmakonzentration bestimmt. Hierbei zeigte sich ein signifikanter Anstieg des AGP in Abhängigkeit zur Tumorlast [96]. Bei Vorbehandlung mit Imatinib wurde ein deutlich geringerer Anstieg des AGP beobachtet.

Somit beeinflusst Imatinib in diesem Mausmodell die Plasmakonzentration des AGP direkt durch Induktion der AGP Expression und indirekt durch Reduktion des Tumors unter Imatinib-Therapie, die zu einer Senkung des AGP Spiegels im Blut führt.

Um diesen inhibitorischen Effekt des physiologisch vorhandenen AGP auf Imatinib zu überwinden, wurde nach potentiellen Bindungspartnern von AGP gesucht, die durch eine entsprechend höhere Bindungsaffinität Imatinib aus der Plasmaproteinbindung verdrängen könnten. Hierbei stellten sich Erythromycin und Clindamycin als potentielle Substanzen heraus. Erythromycin verdrängte in Versuchstieren mit inokulierten bcr-abl positiven KU812-Zellen Imatinib aus der Proteinbindung mit AGP, steigerte auf diese Weise den freien Anteil und stellte somit die Effektivität des Imatinibs wieder her. Eine Interaktion zwischen Imatinib und Erythromycin konnte ausgeschlossen werden [96].

Diese präklinischen Maus-Experimente validierten die Hypothese einer Hemmung der Aktivität des Imatinib durch AGP bzw. die Aufhebung der Hemmung durch zusätzliche Gabe von Erythromycin.

Die Bestätigung dieses Modells im Patienten steht jedoch noch aus.

1.6.3 Molekulare Verlaufs- und Prognoseparameter

1.6.3.1 bcr-abl mRNA

Die Bestimmung der bcr-abl Transkriptkinetik mit Hilfe von bcr-abl spezifischen PCR-Verfahren ermöglicht nicht nur eine Evaluation des Krankheitsverlaufes und der Effizienz der Behandlung sondern auch das Bestimmen einer minimalen Resterkrankung [99]. Die Echtzeitfluoreszenz-PCR-Technik wurde in unserer Arbeitsgruppe für bcr-abl mRNS etabliert und standardisiert [100].

1.6.3.2 Wilms Tumor-Gen 1 (WT1) mRNA

Das WT1 Gen ist auf dem Chromosom 11p13 lokalisiert und besteht aus zehn Exons. Exon 7-10 kodieren vier Zinkfinger des Cys2-His2-Typs am C-terminalen Ende des

WT1 Proteins während in der Nähe des N-terminalen Endes eine prolin- und glutaminreiche Aktivator/Repressor-Domäne existiert. Durch differentielles Splicen werden 32 verschiedene Isoformen exprimiert [101, 102].

Die Funktion von WT1 besteht bei der transkriptionellen Regulation aus der Fähigkeit, die Transkription bestimmter Zielgene zu aktivieren oder zu unterdrücken – abhängig vom zellulären Kontext – dem Zielpromotor und der WT1 Isoform. Als Zielgene wurden bislang u.a. identifiziert: epidermal growth factor-1 (EGF1) [103], platelet derived growth factor-A (PDGF-A) [104], retinoic acid receptor- α (RAR α) [105], bcl-2 und c-myc [106] sowie p53 [107].

Während der Embryogenese ist das WT1 Protein an der Regulation von Wachstum und Differenzierung beteiligt (zeit- und gewebsspezifische Expression). Beim Erwachsenen findet sich das WT1 Protein nur noch in geringen Mengen in den Zellkernen einiger normaler Gewebe wie z.B. in den Nieren.

Zur physiologischen und pathologischen Bedeutung ist bislang wenig bekannt. In den normalen hämatopoetischen Zellen wird WT1 mRNA nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen im Gegensatz zu leukämischen Zellen, bei denen WT1 Transkripte stark erhöht sind [108, 109]. Der Nachweis der WT1 Expression in CD34+-Vorläuferzellen (Knochenmark und Nabelschnurblut) legt den Verdacht einer Rolle während der frühen Hämatopoese nahe. Es gibt ausserdem unterschiedliche Auffassungen darüber, ob die deutliche Expression des WT1 Proteins in leukämischen Blasten ein Epiphänomen darstellt oder eine pathokausale Rolle einnimmt – gleichermassen bei akuten lymphatischen (ALL), akuten myeloischen (AML) und chronischen myeloischen (CML) Leukämien. In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der WT1 RNS-Gehalt in peripheren Blutzellen mit der Progression akuter Leukämien korreliert und sich zur Verlaufsbeobachtung minimaler Resterkrankungen (MRD) eignet [110].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der WT1 RNS-Gehalt im Krankheitsverlauf der CML-Patienten unter Imatinib-Therapie untersucht und in Zusammenhang mit den anderen Messparametern gesetzt. Die Echtzeitfluoreszenz-PCR-Technik wurde in unserer Arbeitsgruppe für WT1 mRNA etabliert und standardisiert [111].

2 FRAGESTELLUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 69 CML-Patienten untersucht, die in einem erweiterten Studienprogramm rekrutiert und mit Imatinib behandelt wurden:

In die CSTI571-0113 Studie wurden CML-Patienten in chronischer Phase, in die CSTI571-0114 Studie CML-Patienten in akzelerierter Phase und in die CSTI571-0115 Studie Patienten in Blastenkrise rekrutiert.

Ziel dieser Arbeit war einerseits die Klärung der Möglichkeit einer kompletten Eradikation des leukämischen Klons und die Bestimmung des Zeitpunkts des Wirkungseintritts nach Therapiebeginn mit Imatinib, unter Einbeziehung von Wirkungsdauer und Möglichkeit einer Verlängerung der Überlebenszeit des CML-Patienten.

Andererseits wurden im Verlauf einer Imatinib-Therapie molekulare Verlaufsparemeter (bcr-abl, Wilms-Tumor-1-Gen (WT1), Multidrug-Resistance-1-Gen (MDR1) und α 1-saures Glykoprotein (α 1sGP, AGP) untersucht und diese anschließend sowohl untereinander als auch mit den individuellen klinischen Daten in Korrelation gebracht.

Desweiteren wurde in dieser Arbeit die bcr-abl Transkriptkinetik zur Evaluation des Verlaufes und der Effizienz der Behandlung der Imatinib-Therapie untersucht. Für MDR1 und WT1 wurde schon in früheren Studien gezeigt, dass beide gute Verlaufsparemeter darstellen [78, 110]. Eine Verlaufsbeobachtung dieser Paremeter im Zusammenhang mit CML-Patienten unter Imatinib-Therapie ist neu und u.a. Gegenstand dieser Arbeit.

Da noch nicht geklärt ist, mit welcher Frequenz und in welchen Fällen Resistenzen gegen Imatinib auftreten, bestand der zweite Teil dieser Arbeit in der Etablierung eines Assay zur Analyse der von Gorre et al. (2001) und anderen Gruppen beschriebenen Mutationen. Alle rezidierten CML-Patienten in den hier vorgestellten Studien wurden auf diese Mutationen hin untersucht [67, 87, 88, 90, 91, 92, 93, 94]. Das Vorliegen der Mutation wie auch der genaue Zeitpunkt des Auftretens im Krankheitsverlauf konnten durch einen in dieser Arbeit etablierten PNA-Clamping Assay bestimmt werden. In Korrelation zur Klinik konnte somit eine Aussage über die Bedeutung dieses Mutationsauftretens für eine Imatinib-Resistenz getroffen und als Prognosemarker genutzt werden.

3 PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN

3.1 PATIENTEN

3.1.1 Klinische Studien

Alle im Rahmen dieser Doktorarbeit untersuchten Patienten sind innerhalb sogenannter „advanced access“- Studien behandelt worden. Hierbei handelt es sich um drei multizentrische Phase II-Studien, CSTI571-0113/-0114/-0115.

In die Studie für CSTI571-0113-Patienten konnten ausschliesslich chronische Phase-Patienten rekrutiert werden, die bereits eine Therapie mit IFN α erhalten hatten. In die Studien für akzelerierte Phase bzw. Blastenkrise wurden sowohl Patienten mit vorangegangenen Therapien als auch Patienten mit neu diagnostizierter CML in akzelerierter Phase oder Blastenkrise aufgenommen. Im Folgenden sind die Ein- und Ausschlusskriterien der einzelnen Studien zusammengefasst.

Alle Studien umfassten nur Patienten mit einem Alter von mindestens 18 Jahren und mit Ph-Chromosom-positiver CML. Patienten, die Ph-Chromosom-negativ, aber BCR-ABL positiv waren, wurden ebenfalls eingeschlossen. Alle Studienteilnehmer mussten sich schriftlich einverstanden erklären.

Spezielle Einschlusskriterien für Patienten in chronischer Phase (CSTI571-0113):

Es wurden Patienten eingeschlossen, die entweder refraktär, resistent oder intolerant gegenüber einem IFN α -haltigen Therapieregimes waren. Die Kriterien waren folgendermaßen definiert:

1. Hämatologische Resistenz: Fehlende komplette hämatologische Antwort, die mindestens einen Monat lang anhielt trotz einer 6-monatigen oder länger andauenden Therapie mit IFN α .
2. Zytogenetische Resistenz: Knochenmarkszytogenetik, die $\geq 65\%$ Ph-Chromosom-positiver Zellen zeigt nach einer mindestens ein Jahr andauernder Therapie mit IFN α .
3. Zytogenetisch refraktär: Ein Wachstum von Ph-Chromosom-positiven Knochenmarkszellen um mindestens 30% (z.B. von 20% auf 50% oder von 30% auf 60%), bestätigt durch zwei Knochenmarkspunktate, die mindestens einen Monat auseinander lagen, oder aber ein Wachstum auf $\geq 65\%$.

4. Hämatologisch refraktär: Ein Anstieg von Leukozyten (Zuwachs von $\geq 100\%$ bis zu $\geq 20 \times 10^9/L$) während einer $IFN\alpha$ enthaltenen Therapie, bestätigt durch zwei Blutproben, deren Entnahmen mindestens zwei Wochen auseinander lagen.
5. Intoleranz: Eine dokumentierte \geq Grad 3 nicht hämatologische Toxizität, die länger als zwei Wochen bestand unter Therapie mit $IFN\alpha$. Die Diagnosestellung bei Patienten, die gegenüber $IFN\alpha$ intolerant sind, muss mehr als drei Wochen zurückliegen.

Spezielle Einschlusskriterien für Patienten in akzelerierter Phase (CSTI571-0114):

1. Prozentsatz an Blasten in peripherem Blut oder Knochenmark $\geq 15\%$ aber
2. $< 30\%$.
3. Prozentsatz an Blasten plus Promyelozyten im peripheren Blut oder Knochenmark $\geq 30\%$ (vorausgesetzt, dass weniger als 30% Blasten im Knochenmark vorhanden sind).
4. Periphere Basophile $\geq 20\%$.
5. Thrombozytopenie $< 100 \times 10^9/L$, unabhängig von der Therapie.
6. Klonale Evolution des leukämischen Klons.
7. Patienten, auf die die Kriterien für eine akzelerierte Phase zutreffen, dürfen vor Studienbeginn nicht in einer Blastenkrise gewesen sein.

Spezielle Einschlusskriterien für Patienten in Blastenkrise (CSTI571-0115):

8. Prozentsatz an Blasten in peripherem Blut oder Knochenmark $> 30\%$.
9. Blastenkrise, definiert nach durchflusszytometrischen Kriterien.
10. Vorliegen extramedullärer Krankheit neben Milz, Lymphknoten und/oder Leberbeteiligung.

Für alle drei Studien galten folgende Ausschlusskriterien: eine mögliche Schwangerschaft, ein „Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Performance

Status Score“ größer als oder gleich 3, eine Kreatininkonzentration, die mehr als doppelt so hoch liegt wie der Höchstwert des Normalbereiches oder eine kardiale Erkrankung vom Grad 3 oder 4 (definiert nach den New York Heart Association (NYHA)-Kriterien).

Weitere Ausschlusskriterien waren speziell definierte pathologische Maximalwerte für Kreatinin, SGOT (AST), SGPT (ALT) und totales Serumbilirubin. Die Patienten mussten ausserdem zytotoxische Substanzen wie Hydroxyurea, AraC, Busulfan, IFN α , Homoharringtonin, Anthrazycline, Mitoxantron, Etoposid, Methotrexat oder Cyclophosphamid zu definierten Zeitpunkten vor dem Therapiebeginn mit Imatinib absetzen.

3.1.2 Klinische Charakteristika des Studienkollektivs

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 69 Patienten am Campus Virchow Charité, Humboldt Universität Berlin untersucht. Bei allen Patienten wurde die Diagnose einer BCR-ABL positiven CML durch Knochenmarksaspiration einschliesslich zellulärer, zytogenetischer und molekularer Analyse bestätigt. Zusätzlich zu dieser ersten Analyse wurde in wöchentlichen bzw. maximal monatlichen Abständen bei den Patienten eine Blutbildkontrolle mit Differentialblutbild und alle 12 Wochen eine Knochenmarkspunktion durchgeführt. Während der Studie wurde kein anderes zytoreduktives Medikament verabreicht. Tab. 4 und 5 fassen den klinischen Zustand vor Therapie mit Imatinib zusammen. Hierbei zeigt Tab. 4 die Verteilung des Geschlechtes und das mittlere Alter der Patienten, sowie die Therapiedauer vor Imatinib. Tab. 5 enthält Angaben über die mittlere Leukozytenzahl und die mittlere Thrombozytenzahl (A), sowie Angaben zur Zytogenetik (B) zu Beginn der Therapie mit Imatinib. Die mittleren Blutwerte repräsentieren jedoch nicht das Ergebnis einer vorangegangenen IFN α -Therapie, da laut Studienprotokoll die IFN α -Therapie zwei Wochen vor Beginn der Therapie mit Imatinib abgeschlossen sein musste.

Tabelle 4. Klinische Daten der Patienten vor Beginn der Imatinib-Therapie.

	CSTI571-0113	CSTI571-0114	CSTI571-0115	insgesamt
Patientenzahl	37	21	11	69
Geschlecht (M : F)	18 : 19	10 : 11	4 : 7	32 : 37
Mittl. Alter [Jahre]	55,2 (23-80)	54,8 (29-73)	59,3 (32-82)	56,4 (23-82)
Mittl. Therapiedauer vor Imatinib [Monate]	43,6 (7-184)	51,1 (1-149)	31,8 (7-74)	126,5 (1-184)

Tabelle 5. Hämatologische Daten (A) und zytogenetische Daten (B) der Patienten vor Beginn der Imatinib-Therapie.

A:

	CSTI571-0113	CSTI571-0114	CSTI571-0115	insgesamt
Mittl. Leukozytenzahl [109/L]	12,1 (3,4-96)	56,1 (4,5-150)	42,4 (0,3-182)	36,7 (0,3-182)
Mittl. Thrombozyt.-Zahl [109/L]	420,8 (90-1134)	546 (20-1650)	217,3 (9-877)	394,7 (9-1650)

B:

CSTI571- Studie (Patienten in n)	<u>0113</u> (n=37)	<u>0114</u> (n=21)	<u>0115</u> (n=11)
<u>Ph-positive Metaphasen:</u>			
100% positiv	31 (83.8%)	18 (85,7%)	10 (90,9%)
weniger als 100% positiv	5 (13.5%)	2 (9,5%)	1 (9,1%)
Im Karyogramm zytogenetisch negativ aber in der FISH-Analyse positiv	1 (2.7%)		
Punctio sicca		1 (4,8%)	
<u>Andere chromosomale Aberrationen</u>	4 (10,8%)	10 (48%)	6 (54,5%)

3.2 REAGENTIEN, OLIGONUKLEOTIDE UND GERÄTE

3.2.1 Chemikalien, Enzyme, Kits und Rezepte

Tabelle 6. Chemikalien, Enzyme und Kits, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

Reagenzien	Firma
10x PCR Puffer PE	Perkin Elmer Cetus, USA
10x PCR Puffer Gibco	Gibco BRL, Eggenstein
Agarose	Serva, Heidelberg
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Ampli Taq DNS Polymerase (5U/μl)	Perkin Elmer Cetus
Aqua dest.	Braun, Melsungen
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Freiburg
Chloroform	Merck, Darmstadt
DEPC- Wasser	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Desoxynukleosidtriphosphate-Set (dNTPs) (10mM)	Gibco BRL, Eggenstein
Dextran	Roth, Karlsruhe
Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA-Titriplex)	Merck, Darmstadt
DNS-Leiter 123 bp	Gibco BRL, Eggenstein
DTT (0.1mM)	Gibco BRL, Eggenstein
EDTA	Merck, Darmstadt
Eisessig (Essigsäure 100%)	Merck, Darmstadt
Ethanol	Serva, Heidelberg
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Gibco Taq Polymerase Platinum (5U/μl)	Gibco BRL, Eggenstein
Glycerol	Gibco BRL, Eggenstein
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid [MgCl ₂] (50mM)	Gibco BRL, Eggenstein
Na-Acetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid [NaCl]	Merck, Darmstadt
Nusieve (GTG-Agarose)	FMC-Products
Paraffinöl	Merck, Darmstadt
PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung (10x))	Gibco BRL, Eggenstein
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Pd(N) ₆ Random Hexamer Primer	Amersham Biosciences GmbH, Freiburg

Reagenzien	Firma
RNSclean	Thermo Hybaid, Ashford, Middlesex, UK
SDS (Dodecylsulfat-NaCl)	Serva, Heidelberg
Saccharose	Serva, Heidelberg
Superscript	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt
<u>Kits:</u>	
Qiaquick Gel Extraktions Kit	Qiagen, Hilden
Topo-TA Cloning Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
▶ M13 Primer forward/ reverse (siehe 3.2.2)	

Rezepte

Dextranlösung: (steril, 4°C, 5%)	20 g Dextran 3,504 g NaCl 400 ml Aqua dest.
10x Lysepuffer:	8,02 g 1,5M Ammoniumchlorid 1,0 g 0,1M Kaliumhydrogencarbonat 0,037 g EDTA mit 2H ₂ O = Titriplex III 100 ml Aqua dest.
STE:	1 ml 1 M Tris (pH 8,0) 2 ml 5 M NaCl 0,2 ml 0,5M EDTA (pH 8,0) 96,8 ml Aqua dest.
Proteinase K: (20 mg/ml, 20°C)	100 mg gelöst in 5ml Aqua dest.
Na-Acetat: (3 M, 20°C)	204,12 g ad 500 ml Aqua dest.
TE-Puffer: (pH 8,0 / 20°C)	2ml 0,5M EDTA (pH 8,0) 10ml 1M Tris (pH 8,0) 1000ml Aqua dest.
TAE-Puffer (1x):	2,42 g Tris 0,57 ml Eisessig 1 ml EDTA (pH=0,8 / 0,5M) 500 ml Aqua dest.
Gelladepuffer:	Succhrose (40%) Bromphenolblau (0,05-0,25%) 10 ml Aqua dest.

3.2.2 Synthetische Oligonukleotide

Sämtliche in dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide wurden von TIB MOLBIOL, Berlin, synthetisiert. Tab. 7 listet die Oligonukleotide auf, die für die quantitative Echtzeitfluoreszenz-PCR verwendet wurden.

Tab. 8 stellt die Oligonukleotide zusammen, die im Rahmen der Mutationsanalyse und für den PNA-Clamping Assay verwendet wurden.

Tabelle 7. Synthetische Oligonukleotide, die im Rahmen der quantitativen Echtzeitfluoreszenz-PCR verwendet wurden. „FAM“ steht für ein 6-Carboxy-Fluorescein Phosphoramidit, „X“ für ein 6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin und „p“ für eine Phosphatgruppe. Die M13-Primer wurden bei der Klonierung eingesetzt.

Funktion	Name	Primer-/ Sondensequenzen
Actin [forward]	RS-3	5'- AgCCTCgCCTTTgCCgA
Actin [reverse]	PS β -Actin as	5'- CTggTgCCTggggCg
Actin- Sonde	QT β -Actin 6-FAM	5'- 6FAM-CCgCCgCCCgTCCACACCCgCC XT p
AGP [forward]	α 1 sGP	5'- CCACCCTggACCAgATCACT
AGP [reverse]	α 1 sGP04 rev	5'- ATgTAaggTCTTggTgTCCCTgA
AGP- Sonde	TM - α 1 sGP01	5'- 6FAM-gCAAgTggTTTTATATCgCATCggCCTT XT C p
bcr-abl [forward]	b2a2	5'- AgCATTCCgCTgACCATCA
bcr-abl [reverse]	abl 3 (78)	5'- gCgTgATgTAgTTgCTTgggAC
bcr-abl Sonde	TM abl 3	5'- 6FAM-TTTgggCT XT CACACCATTCCCCATTg p
MDR1 [forward]	MDR103	5'- CCCATCATTgCAATAgCAggA
MDR1 [reverse]	MDR103 rev	5'- gTTCAAACCTTCTgCTCCTgAgTAC
MDR Sonde	TM- MDR101	5'- FAM-TTgTTgAAATgAAAATgTTgTCTggACAAgCACTgT XT- p
WT 1 [forward]	ET ex 6up	5'- ACAgggTACgAgAgCgATAACCA
WT 1 [reverse]	WT ex 67re	5'- CACACgTCgCACATCCTgAAT
WT 1 Sonde	TM WT fin	5'- 6FAM-CAACgCCCATCCTCTgCggAgCCCA XT p
M13- Primer [forward]		5'- gTAAACgACggCCA - 3'
M13- Primer [reverse]		5'- CAggAAACAgCTATgAC - 3'

Tabelle 8. Synthetische Oligonukleotide, die zur Mutationsanalyse und für den PNA-Clamping Assay verwendet wurden. Bei LC Red 640 und 705 handelt es sich um Fluorochrome.

Funktion	Name	Primer-/ Sondensequenzen
Forward Primer Thr315Ile	ABLx4 F	5'- TggggTCTgCACCCgCgCgC
Forward Primer Glu255Lys und Tyr253His	ABLx56 FM	5'- CTATggTgTgTCCCCCAACTA
Reverse Primer Thr315Ile, Glu255Lys und Tyr253His	ABLx6 R	R 5'- AgTggCCATgTACAgCAgCA
Sensor Sonde Thr315Ile	Sensor [T]s	5'- gTTCTATATCATCATTTgAgTTC -LC Red 705
Sensor Sonde Glu255Lys	Sensor 255	5'- CCCTCgTACACCA7CCCgTACT -LC Red 705
Sensor Sonde Tyr253His	Sensor Val	5'- CCCTCgTACACCAACCCgTAC -LC Red 705
Anchor Sonde Thr315Ile	Anchor	5'- Red 640-gACCTACgggAACCTCCTggACTAC-p
Anchor Sonde Glu255Lys und Tyr253His	255 Anchor	5'- LC Red 640-CCCCgCCCgCTTgTgCTTCA-p
PNA Thr315Ile	STI-T315	5'- TTCTATATCATCACTgAgTT
PNA Glu255Lys und Tyr253His	Y253E255	5'- CgTACACCTCCCCgTACT

Abb. 6 zeigt schematisch die Positionen der einzelnen synthetischen Oligonukleotide zueinander, die in Tab. 8 aufgelistet sind.

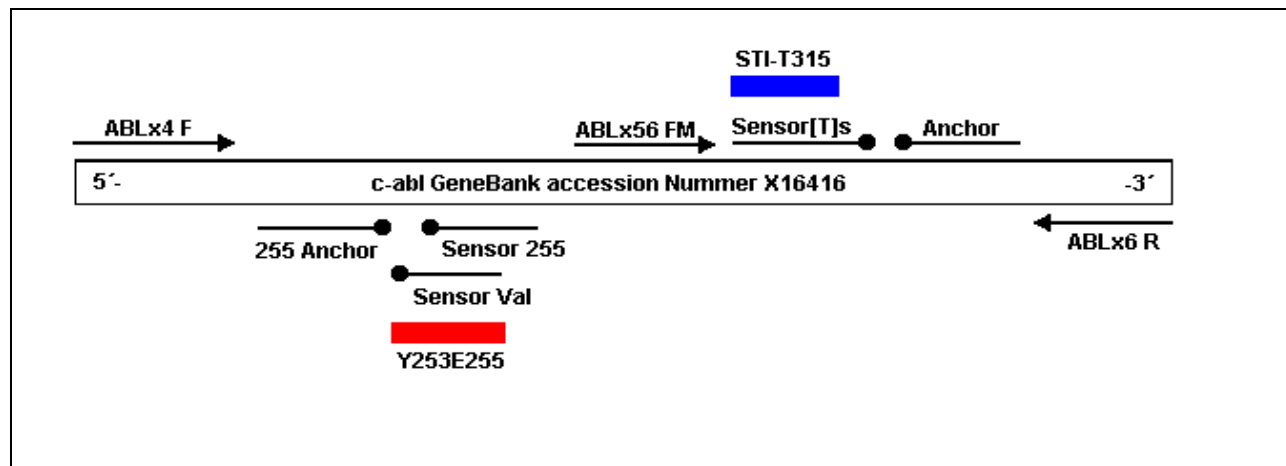


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Oligonukleotid-Positionen.

Die Primer sind als Pfeile dargestellt und überspannen Exon 4 bis 6 der c-abl cDNS-Sequenz. Die Anchorproben tragen das Fluorochrom LC Red 640 für den Energietransfer, wogegen die Sensorproben mit einem Akzeptorfluorochrom LC 705 markiert sind und komplementär zu den spezifischen Mutationen sind. Die Balken symbolisieren die PNA [143].

3.2.3 Technische Geräte

Tabelle 9. Technische Geräte, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

Gerät	Hersteller
ABI PRISM 7700 SDS®	Applied Biosystems, Foster CityUSA
Bio Doc CCD-Camera	Biometra, Göttingen
Gene Quant® II (Spektrophotometer)	Pharmacia Biotech
LightCycler®	Roche
Megafuge® 1.0	Heraeus Instruments
MicroAmp® Optical Caps	Perkin Elmer, Foster City, USA
MicroAmp® Optical Tubes	Perkin Elmer, Foster City, USA
Polyethylen-Reaktionsgefäße (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Polyethylenröhrchen (10 ml)	Falcon, New Jersey, USA
Reax® 2000	GFC
TRIO®-Thermoblock	Biometra
Video Graphik Printer UP-890 CE	Sony
WIDE MINI SUB CELL® (Gelelektrophoresekammer)	Biorad
Zentrifuge 5403	Eppendorf, Hamburg

3.2.4 Hard- und Software

Die Arbeit wurde auf einem IBM-kompatiblen Personal-Computer realisiert. Als Textverarbeitung kam MS Office 2000® (Microsoft Inc. Redmond, USA) zum Einsatz. Abbildungen wurden mit MS Excel®, Origin, Paint und Adobe Photoshop erstellt und bearbeitet. Die statistische Auswertung erfolgte durch das Programm SPSS, SPSS GmbH Software. Auf folgende Internetressourcen wurde zurückgegriffen: Medline/ Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

3.3 PROBENGEWINNUNG UND AUFARBEITUNG

3.3.1 Blutaufarbeitung

Blutproben wurden in sterile Heparinröhrchen entnommen und anschliessend sofort zur Weiterbearbeitung ins Labor gebracht.

3.3.2 Dextran-Separierung, Serum zur AGP Proteinspiegelbestimmung

10 ml Heparinblut wurden mit 2 ml Dextranlösung (steril, 4°C, 5%) versetzt und zur Sedimentation über 40 min bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Der daraufhin abgenommene Überstand wurde anschliessend über 6 min bei 1100 Umdrehungen/min (Upm) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand zur Bestimmung des AGP Proteinspiegels verwendet. Die Zellen wurden in 10 ml Lysepuffer (1x) suspendiert und über 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für die Zellen in Lysepuffer (1x) über 6 min bei 1100 Upm. Der bei diesem Schritt entstandene Überstand wurde erneut verworfen und die resultierenden Zellen sogleich weiterverarbeitet.

Der AGP Proteinspiegel wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Christian Müller im Institut für Labormedizin und Pathobiochemie, Campus Virchow, Charité, Humboldt Universität Berlin, durch immunoturbidimetrische Analyse im COBAS INTEGR400 System mit Hilfe einer COBAS INTEGRA AGP Kassette bestimmt. Dieser Assay basiert auf einer Mischung aus AGP Präzipitat mit spezifischem Antiserum, die turbidimetrisch bei 340nm analysiert wurde.

Die Blutproben der Studienpatienten wurden wöchentlich – vor und während der Therapie mit Imatinib – entnommen und direkt nach Dextran-Separierung analysiert. Der Assay war kalibriert für eine AGP Proteindetektion in einem Bereich von 16-400 mg/dl bei erwarteten Normalwerten von 50-120 mg/dl [112].

3.3.3 RNS-Extraktion

Die aus der Separierung resultierenden Zellen wurden in 1,5ml Reaktionsgefässen zunächst mit 900µl RNSclean Detergenz und anschliessend mit beigefügtem 100µl Chloroform-Isoamylalkohol resuspendiert. Nach 5 min auf Eis wurden die Reaktionsgefässe mit 13000-14000 Upm 30 min zentrifugiert. Der Überstand, max. 600 µl, wurde sofort in ein neues Reaktionsgefäss überführt, welches schon 600 µl gekühltes Isopropanol beinhaltete. Hierbei befanden sich in der Unter- und Interphase DNS und Proteine.

Um die somit gewonnene RNS zu präzipitieren, wurden die Reaktionsgefässe Weiterverarbeitung 15 min auf Eis gestellt. Anschliessend wurde 15 min auf höchster Stufe zentrifugiert, der Überstand abgehoben und verworfen. Es folgte eine

Resuspendierung der RNS mit 500µl Ethanol (steril, 4°C, 75%) und ein erneutes Zentrifugieren der Proben für nochmals 15 min bei 12000 Upm. Der Überstand wurde danach vollständig abgehoben und verworfen.

Nach Verdunsten des Restalkohols wurde die RNS in DEPC/H₂O gelöst.

3.3.4 Reverse Transkriptase

Die Reverse Transkription wurde wie im folgenden beschrieben durchgeführt (Tab. 10 zeigt hierbei den Ansatz (Reaktionsmix) für 1000 ng RNS):

Tabelle 10. Ansatz für die Reverse Transkription

Reagenz	Konzentration	Menge
Random hex Primer	100 µM	1,0 µl
DNTP (ATP, CTP, TTP, GTP)	2,5 mM	5,0 µl
10x PCR-Puffer (Perkin Elmer)		2,0 µl
DTT	0,1 M	2,0 µl
RNSase-Inhibitor		1,0 µl
Superscript		0,7 µl

1. Zu den vorbereiteten Patientenproben von je 8,0 µl (1000 ng mRNS, aufgenommen in DEPC/ H₂O) wurden 10µl Reaktionsmix hinzugefügt.
2. Denaturierung für 3 - 5 min bei 85 - 95°C.
3. Anschliessend wurden die Proben für 1 - 2 min. auf Eis gestellt.
4. Zugabe von 1,0 µl RNSase-Inhibitor und 0,7 µl Superscript in alle Proben.
5. Das Superscript schreibt die RNS in cDNS um.
6. Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur.
7. Inkubation für 40 min bei 42°C.
8. Danach wurden die Proben für 5 min bei einer Temperatur von 95°C in den Hitzeblock gestellt.

Zum Schluss wurden die Proben erneut für 1-2 min auf Eis gestellt und zur Aufbewahrung der cDNS bei -20°C gelagert.

3.3.5 DNA-Konzentrationsbestimmung

Ein Aliquot der zu messenden DNS-Lösung wurde mit Aqua dest. oder TE-Puffer 1:50 verdünnt. Die Bestimmung der DNS-Konzentration erfolgte spektrophotometrisch (Quarzküvette, 1 cm Schichtdicke) durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm. Dabei entspricht die Extinktion von 1 bei doppelsträngiger DNS ungefähr einer Konzentration von 50 µg/ml (Sambrook et al. 1989). Um den Reinheitsgrad der DNS-Lösung zu ermitteln, wurde der Quotient der Extinktionen bei OD260/OD280 bestimmt.

3.4 Klonieren genetischer Fragmente

Zur Erstellung von Standardkurven wurde die cDNS der jeweiligen Gene (AGP, MDR1, bcr-abl und WT1) mit spezifischen Primern aus Normalblut-cDNS in einer konventionellen PCR amplifiziert und dann in einen pCR2.1 Vector (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen, Leek, Niederlande) kloniert.

Einem Restriktionsverdau durch HindIII und XbaI (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) folgte die Reamplifizierung mit M13-Primern und die anschließende Aufreinigung der Plasmidfragmente (PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Molekülzahl wurde durch eine optische Dichtemessung in einem Photometer bestimmt.

3.5 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)

3.5.1 Konventionelle PCR

Tab. 11 zeigt den Ansatz für eine konventionelle PCR, die im Rahmen der Klonierung genetischer Fragmente verwendet wird.

Tabelle 11. Ansatz für eine konventionelle PCR.

Reagenz	Konzentration	Menge
5' Primer	10 µM	1,25 µl
3' Primer	10 µM	1,25 µl
10x PCR-Puffer (Perkin Elmer)		5,0 µl
dNTP	2,5 mM	4,0 µl
Ampli-Taq-Polymerase (Perkin Elmer)		0,25 µl
CDNS		1,0/2,0 µl
Aqua dest.	bis zu einem Gesamtvolumen von 50,0 µl	

3.5.2 Echtzeitfluoreszenz-PCR

Die quantitative Echtzeitfluoreszenz-PCR für das Fusionstranskript des Major-bcr-abl und für das WT1 Transkript wurde in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt und ist auch bereits publiziert [99, 100]. Als quantitative Referenz benutzen wir das β -Actintranskript, das von Primern/ Sonde quantifiziert wird, ohne Pseudogene zu amplifizieren [100].

Tabelle 12. PCR-Ansatz für die Echtzeitfluoreszenz-PCR via Taqman.

Reagenz	Konzentration	Menge
5' Primer	10 µM	2,5 µl
3' Primer	10 µM	2,5 µl
Sonde	10µM	0,5 µl
dNTP	2,5 mM	4,0 µl
10x PCR-Puffer (Gibco GBR)		5,0 µl
TE-Puffer (pH 8,0)		0,8 µl
MgCl ₂	50 mM	4,5 µl
Gibco-Taq-Platinum-Polymerase		0,25 µl
DNS-Probe		2,0 µl
Aqua dest.		27,95 µl
Gesamt		50,0 µl

Tab. 13 stellt die jeweiligen PCR-Bedingungen für die einzelnen Gene dar.

Tabelle 13. Zyklusbedingungen für die PCR mittels Taqman für die einzelnen Gene.

PROGRAMM	BCR-ABL	AGP	MDR1	WT1	ACTIN
1. Initiale Denaturierung	5 min bei 95°C	5 min bei 95°C	5 min bei 95°C	5 min bei 95°C	5 min bei 95°C
2. Denaturierung	1 min bei 95°C	1 min bei 95°C	1 min bei 95°C	1 min bei 95°C	1 min bei 95°C
3. Annealing/Extension	1 min bei 65°C	1 min bei 63°C	1 min bei 63 °C	1 min bei 62°C	1 min bei 67°C
Zyklen (für 2 und 3)	45	45	45	45	45
4. Abkühlung	4°C	4°C	4°C	4°C	4°C

3.5.3 Generierung von Standardkurven

Zur Quantifizierung der PCR-Produkte durch die Echtzeitfluoreszenz-PCR wird eine Standardkurve des jeweils zu bestimmenden Gens benötigt. Nach Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung der klonierten Fragmente (siehe 3.3.4) wird eine Verdünnungsreihe hergestellt, die einen Bereich von 107 bis 100 Moleküle pro 100ng DNS in TE-Puffer, pH 8.0 und Aqua dest. umfasst.

3.6 MUTATIONSANALYSE IM LIGHTCYCLER®

Im Anschluss an eine Echtzeitfluoreszenz-PCR im LightCycler® kann durch Schmelzen – langsames Aufheizen von 45°C bis zu 85°C – im selben Ansatz eine qualitative Information über das Zielsequenzziel werden.

Diese Methode eignet sich vor allem zur Genotypisierung und Mutationsdetektion.

Tabelle 14. PCR-Ansatz für eine Mutationsanalyse im Lightcycler.

Reagenz	Konzentration	Menge
dNTP	2,5 mM	4,0 µl
10x PCR-Puffer (Gibco GBR)		2,5 µl
TE-Puffer (pH 8,0)		0,3 µl
MgCl ₂	50 mM	2,0 µl
Bovines Serumalbumin (BSA)	600 µg/ml	0,3 µl
5' Primer	10 µM	1,5 µl
3' Primer	10 µM	1,5 µl
Sonde	10µM	1,0 µl
Anchor	10µM	1,0 µl
Gibco-Taq-Platinum-Polymerase		0,25 µl
DNS-Probe		1,0 µl
Aqua dest.		9,65 µl
Gesamt		25,0 µl

3.7 DNA-SEQUENZIERUNG

Ausgewählte PCR-Produkte wurden durch die Firma Agowa direkt von einem automatischen Sequenzer (ABI 710, Applied Biosystem) analysiert.

3.8 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Um den Einfluss der Behandlung mit Imatinib auf CML-Patienten in chronischer Phase, akzelerierter Phase und Blastenkrise zu analysieren, wurde eine zweifaktorielle nicht-parametrische Varianzanalyse mit den Faktoren: molekulare Parameter und Zeit erstellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Unterstützung von Tanja Schink aus dem Institut für Medizinische Biometrie, Campus Charité Mitte, Humboldt-Universität Berlin [113].

4 ERGEBNISSE

4.1 THERAPIEERGEBNISSE

Insgesamt wurden am Campus Virchow der Charité 79 Patienten in die oben genannten CSTI571-0113/-0114/-0115-Studien rekrutiert, von denen 69 Patienten im Rahmen dieser Arbeit untersucht worden sind.

Zur Ermittlung der mittleren Therapiedauer wurde der Zeitraum zwischen dem Tag der ersten Einnahme von Imatinib bis zu dem Datum des zuletzt gemessenen PCR-Ergebnisses für die einzelnen Patienten errechnet. Folglich sind in diese Berechnung auch nur diejenigen Patienten einbezogen worden, von denen dementsprechende PCR-Daten vorlagen, um molekularbiologische Daten in Korrelation zu klinischen Daten setzen zu können. Die mittlere Therapiedauer für Patienten in chronischer Phase (CSTI571-0113) lag bei 5,9 Monaten, für Patienten in akzelerierter Phase (CSTI571-0114) bei 5,5 Monaten und für Patienten in Blastenkrise (CSTI571-0115) bei 4,3 Monaten. Im Laufe des Beobachtungszeitraums verstarben insgesamt 12 Patienten, davon jeweils 3 Patienten in der Studie CSTI571-0113 und der Studie CSTI571-0114 und 6 Patienten in der Studie CSTI571-0115.

Insgesamt rezidierten 21 Patienten, 4 in der Studie CSTI571-0113, 7 in der Studie CSTI571-0114 und 10 in der Studie CSTI571-0115. Tab. 15 vergleicht Patienten mit bzw. ohne Rezidiv. Sie zeigt das mittlere Alter, die mittlere Leukozyten- und Thrombozytenzahl zu Beginn der Therapie mit Imatinib, sowie die mittlere Krankheitsdauer zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses.

Tabelle 15. Klinische Daten der Patienten mit Rezidiv und ohne Rezidiv im Vergleich. N= Anzahl der Patienten.

Patientenzahl	Patienten mit Rezidiv		Patienten ohne Rezidiv	
	Studie CSTI571-0113 n=4	Studie CSTI571-0114 n=6	Studie CSTI571-0113 n=33	Studie CSTI571-0114 n=15
Mittl. Alter vor Imatinib [Jahren]	65,3	57,2	53,9	53,8
Mittl. Therapiedauer vor Imatinib [Monaten]	59,8	59,2	41,7	48,9
Mittl. Leukozytenzahl [$10^9 / L$]	10,2	50,4	12,3	58,4
Mittl. Thrombozytenzahl [$10^9 / L$]	362,8	320,2	427,9	636,4

Sowohl in der CSTI571-0113- als auch in der CSTI571-0114 Studie sind die Patienten mit Rezidiv zu Beginn der Imatinib-Therapie im Durchschnitt älter und länger in vorangegangener Behandlung gewesen.

Die mittleren Leukozytenzahlen bei den Patienten ohne Rezidiv lagen in beiden Studien geringfügig höher.

Im Vergleich der mittleren Thrombozytenzahlen zu Beginn der Therapie mit Imatinib waren diese vor allem in der Studie CSTI571-0114 bei den Patienten ohne Rezidiv deutlich höher als bei den Patienten mit Rezidiv derselben Studie.

4.1.1 Hämatologisches Ansprechen

Ein komplettes hämatologisches Ansprechen ist nach den Kriterien des Studienprotokolls folgendermassen definiert: Leukozyten $< 11 \times 10^9/L$ und Thrombozyten $< 400 \times 10^9/L$ sowie ein normales Differentialblutbild ohne unreife Granulozyten über vier Wochen.

In der Studie CSTI571-0113 führte Imatinib bei 83,8 % (n=31) der Patienten zu einem kompletten hämatologischen Ansprechen. In den Studien CSTI571-0114 und CSTI571-0115 waren es 71,4% (n=15) bzw. 63,6 % (n=7) der Patienten.

Tab. 16 stellt die mittlere Dauer bis zum Eintritt des Rezidivs, die mittlere Dauer des hämatologischen Ansprechens und die Anzahl der refraktären Patienten während der Imatinibtherapie für die einzelnen Studien dar.

Tabelle 16. Klinische Daten zum hämatologischen Ansprechen und Rezidiveintritt, sowie die Anzahl refraktärer Patienten in den einzelnen CSTI571-Studien während der Imatinib-Therapie. N = Anzahl der Patienten.

CSTI571-Studie (rezidierte Patienten in n)	0113 (n=4)	0114 (n=5)	0115(n=10)
Mittlere Dauer bis zum Eintritt des Rezidivs [Wochen]	23,3	29,5	16,3
Mittlere Dauer des hämatologischen Ansprechens [Wochen]	20,8	22,5	5,6
Refraktäre Patienten [n]	-	2,0	2,0

4.1.2 Zytogenetisches Ansprechen

In Übereinstimmung mit dem Studienprotokoll wurden alle 12 Wochen zytogenetische Analysen des Knochenmarks durchgeführt worden. Eine solche zytogenetische Untersuchung erfordert die Analyse von mindestens 20 Metaphasen. Aufgrund von Hypozellularität in den Knochenmarksproben nach Therapiebeginn mit Imatinib waren diese Analysen nicht bei allen Patienten zu jedem Zeitpunkt möglich.

In Tab: 17-19 sind die zytogenetischen Ergebnisse nach jeweils 3, 6 und 9 Monaten der einzelnen Studien aufgelistet. Insgesamt wurden in der CSTI571-0113 Studie 23 Patienten 3 Monate lang, 15 Patienten 6 Monate lang und 5 Patienten 9 Monate lang behandelt. In der CSTI571-0114 Studie wurden insgesamt 15 Patienten 3 Monate lang, 8 Patienten 6 Monate lang und 4 Patienten 9 Monate lang und in der CSTI571-0115 Studie insgesamt 7 Patienten 3 Monate lang behandelt. Tab. 17-19 beschreiben ausserdem das zytogenetische Ansprechen der Patienten sowohl in Bezug auf die Gesamtzahl der behandelten Patienten (Gruppe „alle behandelten Patienten“) als auch in Bezug auf die Gesamtzahl der suffizienten Knochenmarksproben (Gruppe „suffiziente zytogenetische Analysen“).

Um auch Patienten mit hypozellulären Knochenmarksaspiraten und somit nicht ausreichender Metaphasenzahl evaluieren zu können, wurden in einer zusätzlichen Analyse die Daten derjenigen Zytogenetiken berücksichtigt, die mindestens 10 auswertbare Metaphasen aufwiesen. Diese Analyse führte erwartungsgemäss zu generell höheren zytogenetischen Ansprechraten.

Tabelle 17. Darstellung der zytogenetischen Ergebnisse der Chronische Phase-Studie (CSTI571-0113) nach 3, 6 und 9 Monaten. Definitionen für komplettes, partielles und major Ansprechen siehe Kapitel 1.2.3. Suffizient waren die Analysen, wenn sie entweder mehr als 20 oder mehr als 10 analysierbare Metaphasen aufwiesen. N [%] = Anzahl der Patienten mit jeweiligen Ansprechen [Prozent zur Gesamtzahl]. ng= Gesamtzahl der Patienten.

Tabelle 17. Zytogenetische Ergebnisse der Chronische Phase-Studie (CSTI571-0113)

Zytogenetik Anzahl der Patienten n [Anteil in % zur Gesamtzahl n _g]		Komplett n [%]	Partiell n [%]	Major n [%]
nach 3 Monaten	≥ 20 Metaphasen			
	alle behandelten Pat. (n _g =23)	1 [4,3 %]	5 [21,7 %]	6 [26,1 %]
	suffiziente zytogenetische Analysen (n _g =13)	1 [7,7 %]	5 [38,5 %]	6 [42,2 %]
	≥ 10 Metaphasen			
	alle behandelten Pat. (n _g =23)	4 [17,4 %]	6 [26,0 %]	10 [43,5 %]
	suffiziente zytogenetische Analysen (n _g =18)	4 [22,2 %]	6 [33,3 %]	10 [55,5 %]
nach 6 Monaten	≥ 20 Metaphasen			
	alle behandelten Pat. (n _g =15)	6 [40,0 %]	1 [6,7 %]	7 [46,7 %]
	suffiziente zytogenetische Analysen (n _g =8)	6 [75,0 %]	1 [12,5 %]	7 [87,5 %]
	≥ 10 Metaphasen			
	alle behandelten Pat. (n _g =15)	7 [46,7 %]	2 [13,3 %]	9 [60,0 %]
	suffiziente zytogenetische Analysen (n _g =11)	7 [63,6 %]	2 [18,2 %]	9 [81,8 %]
nach 9 Monaten	≥ 20 Metaphasen			
	alle behandelten Pat. (n _g =5)	-	-	-
	suffiziente zytogenetische Analysen (n _g =3)	1 [33,3 %]	-	1 [33,3 %]
	≥ 10 Metaphasen			
	alle behandelten Pat. (n _g =5)	-	-	-
	suffiziente zytogenetische Analysen (n _g =3)	1 [33,3 %]	-	1 [33,3 %]

Tabelle 18. Darstellung der zytogenetischen Ergebnisse der Akzelerierte Phase-Studie (CSTI571-0114) nach 3, 6 und 9 Monaten. Definitionen für komplettes, partielles und major Ansprechen siehe Kapitel 2.1.4. Suffizient waren die Analysen, wenn sie entweder mehr als 20 oder mehr als 10 analysierbare Metaphasen aufwiesen. N [%] = Anzahl der Patienten mit jeweiligen Ansprechen [Prozent zur Gesamtzahl]. n_g= Gesamtzahl der Patienten.

Tabelle 18. Zytogenetische Ergebnisse der Akzelerierte Phase-Studie (CSTI571-0114)

Zytogenetik Anzahl der Patienten n [Anteil in % zur Gesamtzahl n _g]		Komplett n [%]	Partiell n [%]	Major n [%]
nach 3 Monaten	≥ 20 Metaphasen			
	alle behandelten Pat. (n _g =15)	1 [6,6 %]	1 [6,6 %]	2 [13,3 %]
	suffiziente zytogenetische. Analysen (n _g =6)	1 [16,6 %]	1 [16,6 %]	2 [33,3 %]
	≥ 10 Metaphasen			
	alle behandelten Pat. (n _g =15)	1 [6,6 %]	1 [6,6 %]	2 [13,3 %]
	suffiziente zytogenetische Analysen (n _g =8)	1 [12,5 %]	1 [12,5 %]	2 [25,0 %]
nach 6 Monaten	≥ 20 Metaphasen			
	alle behandelten Pat. (n _g =8)	-	-	-
	suffiziente zytogenetische Analysen (n _g =2)	-	-	-
	≥ 10 Metaphasen			
	alle behandelten Pat. (n _g =8)	1 [25,0 %]	-	1 [25,0 %]
	suffiziente zytogenetische Analysen (n _g =4)	1 [25,0 %]	-	1 [25,0 %]
nach 9 Monaten	≥ 20 Metaphasen			
	alle behandelten Pat. (n _g =4)	-	-	-
	suffiziente zytogenetische Analysen (n _g =2)	-	-	-
	≥ 10 Metaphasen			
	alle behandelten Pat. (n _g =4)	-	1 [25,0 %]	1 [25,0 %]
	suffiziente zytogenetische Analysen (n _g =3)	-	1 [33,3 %]	1 [33,3 %]

Tabelle 19. Darstellung der zytogenetischen Ergebnisse der Studie der Blastenkrise (CSTI571-0115) nach 3 Monaten. Definitionen für komplettes/ Major und partielles Ansprechen siehe 2.1.4. Suffizient waren die Analysen, wenn sie entweder mehr als 20 oder mehr als 10 analysierbare Metaphasen aufwiesen. n [%]= Anzahl der Patienten mit jeweiligen Ansprechen [Prozent zur Gesamtzahl]. n_g= Gesamtzahl der Patienten.

Tabelle 19. Zytogenetische Ergebnisse der Studie der Blastenkrise (CSTI571-0115)

Zytogenetik Anzahl der Patienten n [Anteil in % zur Gesamtzahl n _g]		Komplett n [%]	Partiell n [%]	Major n [%]
nach 3 Monaten	≥ 20 Metaphasen			
	alle behandelten Pat. (n _g =7)	-	-	-
	suffiziente zytogenetische Analysen (n _g =4)	-	-	-
	≥ 10 Metaphasen			
	alle behandelten Pat. (n _g =7)	1 [14,3 %]	-	1 [14,3 %]
	suffiziente zytogenetische Analysen (n _g =5)	1 [20,0 %]	-	1 [20,0 %]

4.1.3 Nebenwirkungen

Tab. 20 beinhaltet die im Rahmen dieser Arbeit bei den behandelten Patienten aufgetretenen Nebenwirkungen und ihre Häufigkeitsverteilungen auf. Zu den häufigsten nicht hämatologischen Nebenwirkungen gehörten Knöchel- und Periorbitalödeme, Muskelkrämpfe und Nausea. Weiterhin kam es vereinzelt zu Adipositas, Dermatitis, Exanthemen, Wundheilungsstörungen, Allergien, Fieberinfekten, Erythemen und asthmatischen Beschwerden. Bei den meisten Nebenwirkungen handelte es sich ausschliesslich um Nebenwirkungen vom Grad I und Grad II nach den allgemeinen Kriterien des National Cancer Institute [114]. Lediglich zwei Patienten (je einer aus der CSTI571-0113- und der CSTI571-0114 Studie) entwickelten während der Behandlung mit Imatinib nach 16 bzw. 21 Wochen eine Adipositas vom Grad III/ IV [114]. Eine andere Patientin aus der Studie CSTI571-0113 entwickelte Desweiteren ein Exanthem vom Grad III/ IV schon einen Monat nach Therapiebeginn [115].

Die hämatologischen Komplikationen traten gehäuft bei Patienten in fortgeschritteneren Stadien der CML auf. 8 von 14 Patienten der Studie CSTI571-0113, 9 von 13 Patienten

der Studie CSTI571-0114 und 8 von 11 Patienten der Studie CSTI571-0115 reagierten thrombozytopenisch mit einem Thrombozytenanteil von weniger als 50/ nl.

Tabelle 20. Hämatologische und nicht hämatologische Nebenwirkungen.

Nebenwirkungen	Anzahl der Patienten mit Nebenwirkung (Anteil in % zur Gesamtzahl in der Studie)		
	CSTI571- 0113-Studie	CSTI571- 0114-Studie	CSTI571- 0115-Studie
<u>Nicht hämatologische:</u>			
Periorbitalödeme	7 (18,9)	9 (42,9)	4 (36,4)
Andere Ödeme	8 (21,6)	5 (23,8)	1 (9,1)
Nausea	1 (2,7)	4 (19,0)	3 (27,3)
Krämpfe	7 (18,9)	6 (28,9)	2 (18,2)
Adipositas	2 (5,4)	2 (9,5)	-
Dermatitis	-	2 (9,5)	-
Exanthem	2 (5,4)	1 (4,7)	1 (9,1)
Wundheilungsstörungen	1 (2,7)	1 (4,7)	-
Allergie	1 (2,7)	-	-
Fieberinfekt	1 (2,7)	-	-
Erythem	1 (2,7)	-	-
Asthmatische Beschwerden	1 (2,7)	-	-
Sonstige		10 (47,6)	5 (45,5)
<u>Hämatologische:</u>			
Neutropenie [Leukozyten < 1,0/nl]	-	4 (19,0)	3 (27,3)
Anämie [Hb < 8g/dl]	3 [8,1]	8 [38,1]	4 [36,4]
Thrombozytopenie [< 100/nl]	14 [37,8]	13 [61,9]	11 [100,0]

4.2 AGP SERUMSPIEGEL

Die Abb. 7A, B und C zeigen den Verlauf der medianen AGP Plasmaproteinwerte unter Therapie mit Imatinib. Der Normbereich bei einem Gesunden liegt zwischen 50 und 120 g/dl.

Vor Therapiebeginn mit Imatinib lag der medianen AGP Plasmaproteinwert in der Studie CSTI571-0113 für das nicht rezidierte Patientenkollektiv im Normbereich (A).

Der entsprechende Wert für die rezidierten Patienten der CSTI571-0113 war dagegen pathologisch erhöht (148,5 g/dl) (A). In der Studie CSTI571-0114 waren die medianen AGP Plasmaproteinwerte zum Zeitpunkt 0 für die nicht rezidivierten (141g/dl) und rezidierten Patienten (179,5 g/dl) oberhalb des Normbereich (B). Da 10 von 11 Patienten der Studie CSTI571-0115 (C) rezidierten, wurde hier auf eine entsprechende Trennung zwischen Patienten mit und ohne Rezidiv verzichtet. Der mediane AGP Plasmaproteinwert in der Studie CSTI571-0115 war mit 183,5 g/dl vor der Therapie mit Imatinib ebenfalls pathologisch erhöht.

In den Studien CSTI571-0113 und CSTI571-0114 zeigten sich im Verlauf in der Gruppe der rezidierten Patienten höhere mediane AGP Plasmaproteinwerte als im Vergleich zur Gruppe der nicht rezidivierten Patienten. Bei den rezidierten Patienten der Studie CSTI571-0113 kam es lediglich im 4. Monat zur kurzzeitigen Normalisierung der medianen AGP Plasmaproteinwerte. Die medianen AGP Plasmaproteinwerte bei nicht rezidivierten Patienten der gleichen Studie überstiegen im gesamten Beobachtungszeitraum nicht den Normbereich (A). In der Studie CSTI571-0114 kam es bis zum 3. Monat zu einer signifikanten Senkung der medianen AGP Plasmaproteinwerte bei nicht rezidivierten Patienten in den Normbereich, woran sich im Laufe des Untersuchungszeitraumes auch nichts mehr veränderte ($p=0,007$). Die rezidierten Patienten in der Studie CSTI571-0114 (B) erreichten keine normalen medianen AGP Plasmaspiegel.

Für die Patienten der Studie CSTI571-0115 (C) kam es bis zum 4. Monat zu einem statistisch signifikanten Abfall ($p=0,051$) der Plasmaproteinwerte, wobei im 5. Monat wieder eine Tendenz nach oben zu beobachten.

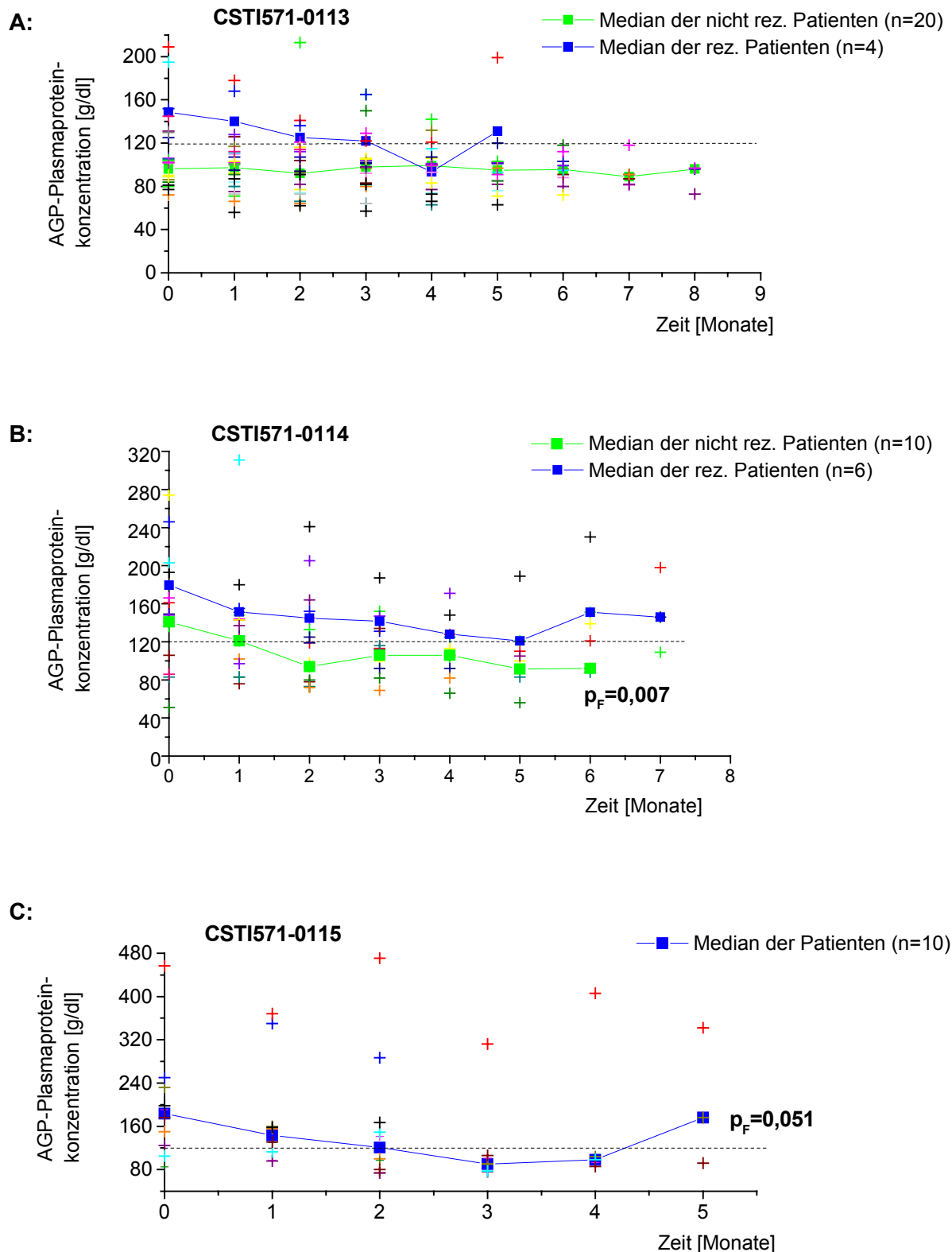


Abbildung 7. Die Abbildung zeigt die medianen AGP Werte der Patienten in der Studie CSTI571-0113 (A), Studie CSTI571-0114 (B) und CSTI571-0115 (C). Nur in A und B sind die Patienten mit und ohne Rezidiv getrennt dargestellt. Auf der x-Achse ist die Therapiedauer und auf der y-Achse die AGP Plasmaproteinkonzentration angegeben. Die horizontale Linie begrenzt den oberen Normwert für die AGP Plasmakonzentration [120 g/dl]. Die Anzahl der Patienten zum Zeitpunkt 0 wird durch n angegeben.

4.3 ERGEBNISSE DER QUANTITATIVEN ECHZEIT-FLUORESZENZ-PCR

Die PCR-Daten der Studien lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- CSTI571-0113: Insgesamt lagen Messdaten von 24 Patienten vor. 4 Patienten sind rezidiert.
- CSTI571-0114: Insgesamt lagen Messdaten von 17 Patienten vor.
- CSTI571-0115: Insgesamt lagen Messdaten von 11 Patienten vor.

Abb. 9, 10, 11 und 12 zur molekularbiologischen Verlaufsdarstellung wurden aus den Messdaten der Echtzeitfluoreszenz-PCR und daraus ermittelten Medianwerten erstellt. Die Medianwerte setzen sich aus mindestens 3 Messdaten von 3 verschiedenen Patienten zusammen. Im Falle der rezidierten Patienten setzen sich die Medianwerte nur aus mindestens 2 Messwerten zusammen, da die Gruppe der rezidierten Patienten in der Studie CSTI571-0113 nur insgesamt 4 Patienten und in der Studie CSTI571-0114 nur insgesamt 6 Patienten umfasste.

Über eine nicht-parametrische Varianzanalyse wurde die Signifikanz eines Abfalles oder Ansteigens der Verlaufskurve geprüft. Dabei wurden der erste und der letzte Medianwert verglichen. Ausserdem wurde errechnet, ob sich die Medianverläufe nicht rezidierten Patienten und rezidierten Patienten statistisch signifikant unterscheiden.

Da β -Aktin für die Quantifizierung das Referenzgen darstellte, wurden die gemessenen Kopienzahlen der untersuchten molekularen Parameter in Relation zur gemessenen Kopienzahl des β -Aktin derselben cDNS gesetzt.

4.3.1 Darstellung von Standardkurven

Zur Quantifizierung spezifischer Gensequenzen bedarf es der Erstellung von Standardreihen. Dabei laufen bekannte Kopienzahlen klonierter, spezifischer Gensequenzen in jeder PCR mit, beginnend mit $1,0E+01$ und aufsteigend bis $1,0E+07$.

Durch die ct-Werte der einzelnen Standards wird eine Funktionsgerade mit der Steigung m gezogen. Eine gute Korrelation (korr.) der ct-Werte, die bestenfalls bei 1 liegt, ist für eine optimale Quantifizierung der Ausgangskopienzahlen notwendig. Abb. 8 stellt die seriellen Standardverdünnungsreihen (107 bis 101 Kopien) von β -Actin(A), bcr-abl(B), WT1(C), MDR1(D) und AGP(E) mRNS dar.

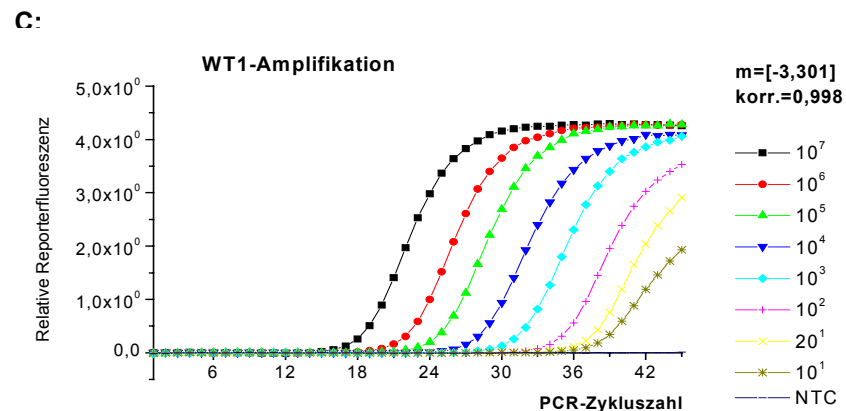
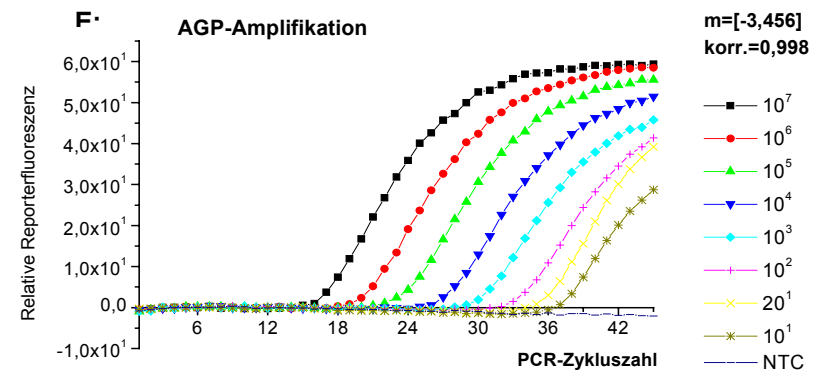
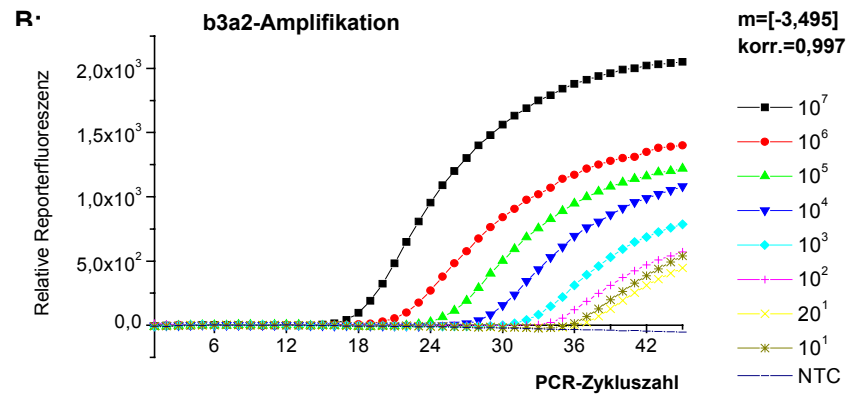
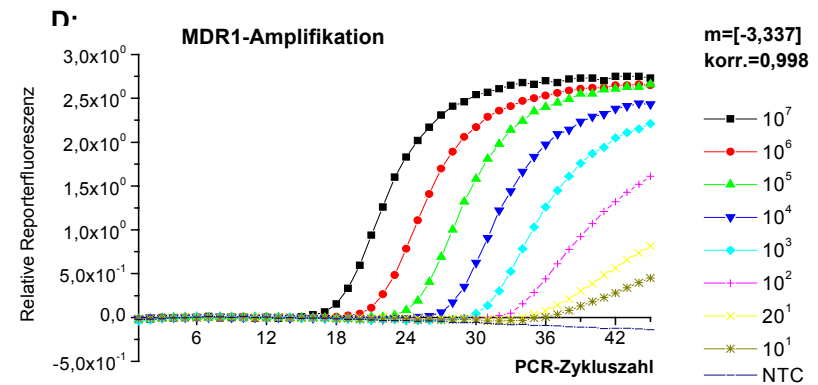
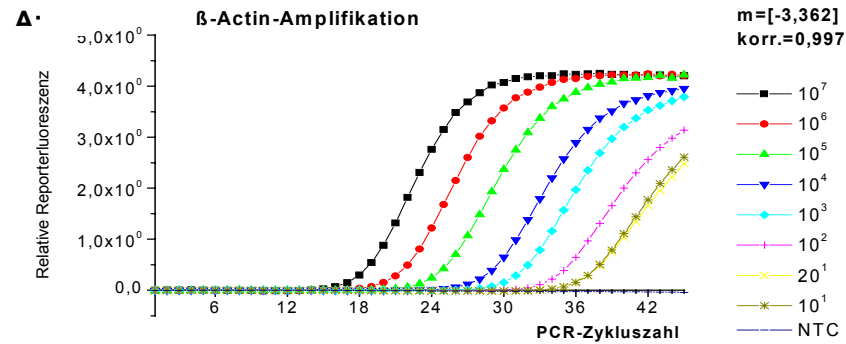


Abbildung 8. Diese Abbildung zeigt die seriellen Standardverdünnungsreihen (10^1 bis 10^7 Kopien) von β -Actin(A), bcr-abl(B), WT1(C), MDR1(D) und AGP(E) mRNS.

Auf der x-Achse ist jeweils die PCR-Zykluszahl und auf der y-Achse die relative Reporterfluoreszenz dargestellt. Die Steigung m wird bestimmt durch eine Ausgleichsgerade, die durch die 1. Ableitungen der einzelnen Standardverdünnungen gezogen wird. Die Korrelation (korr.) der 1. Ableitungen im C_t zur Ausgleichsgeraden stellt ein Mass für die Genauigkeit der jeweiligen Standardverdünnung dar.

4.3.2 bcr-abl mRNS Transkripte

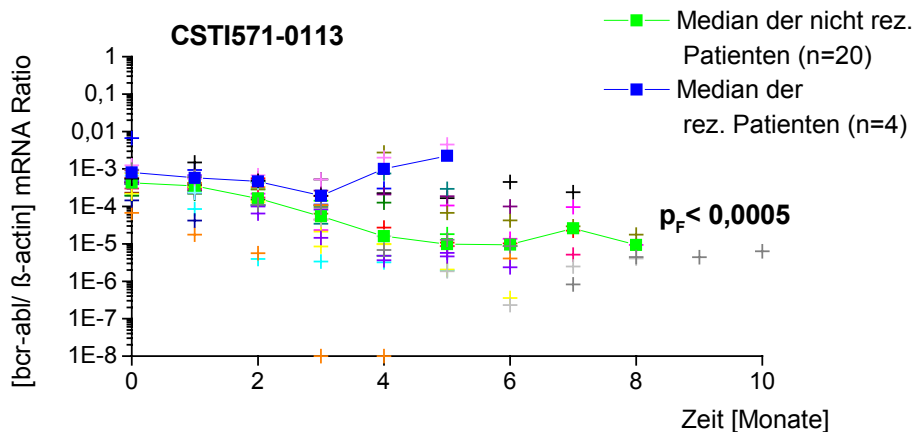
Abb. 9 zeigt die Verläufe der [bcr-abl/ β -actin] mRNS Ratio im Verlauf der Imatinib-Therapie.

Für die Studien CSTI571-0113 (A) und CSTI571-0114 (B) sind die Verläufe der rezidierten (rez.) und nicht rezidierten (nicht rez.) Patienten getrennt dargestellt. Bei der Studie CSTI571-0115 (C) werden die rezidierten und nicht rezidierten Patienten in einem Verlauf betrachtet. Die Anzahl der Patienten in den jeweiligen Gruppen zum Zeitpunkt 0 wird durch n angegeben.

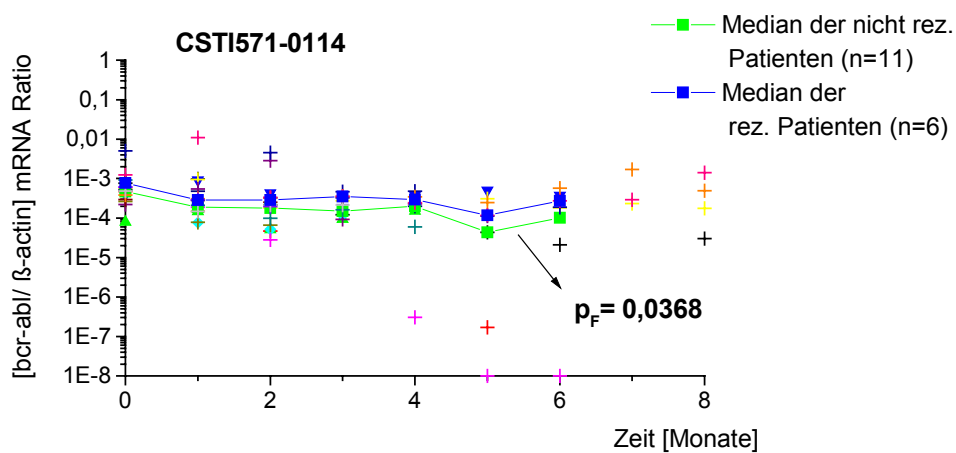
Zwei Patienten wurden im Verlauf der Studien vorübergehend bcr-abl negativ. Hierbei handelte es sich um einen Patient in der Studie CSTI571-0113 in den Monaten 3 und 4 bzw. eine Patientin in der Studie CSTI571-0114 in den Monaten 5 und 6.

Als statistisch signifikant sind die Abfälle für die nicht rezidierten Patienten der Studien CSTI571-0113 ($p < 0,0005$) und CSTI571-0114 ($p = 0,0368$) zu sehen.

A:



B:



C:

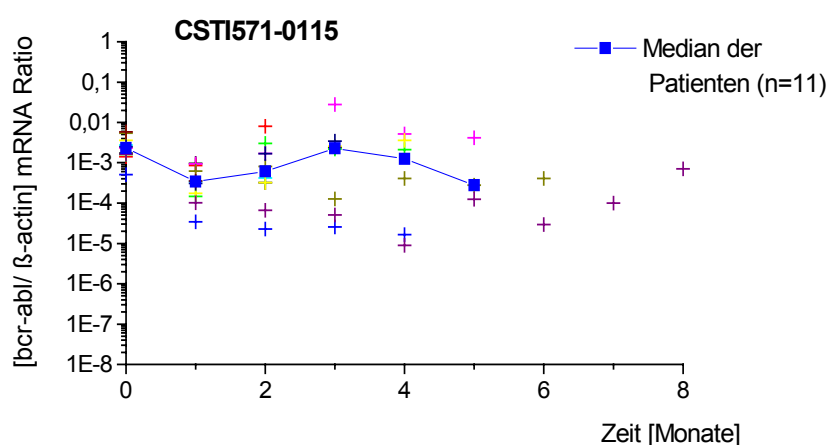


Abbildung 9. Verläufe der medianen [bcr-abl/ β -actin] mRNS Ratio (y-Achse, logarithmisch) für die einzelnen Studienkollektive im Verlauf der Therapie (x-Achse, linear). N stellt die Anzahl der Patienten dar.

4.3.3 AGP mRNS Transkripte

Abb. 10 zeigt den Verlauf der [AGP/ β -actin] mRNS Ratio im Verlauf der Behandlung mit Imatinib.

Für die Studien CSTI571-0113 (A) und CSTI571-0114 (B) sind die Verläufe der rezidierten (rez.) und nicht rezidierten (nicht rez.) Patienten getrennt dargestellt. Bei der Studie CSTI571-0115 (C) werden beide Gruppen zusammengefasst betrachtet. N gibt die Anzahl der Patienten in den jeweiligen Gruppen zum Zeitpunkt 0 an.

Statistisch signifikant ist der Abfall der rezidierten Patienten der Studie CSTI571-0113 ($p < 0,0005$) sowie der Abfall der nicht rezidierten Patienten der Studie CSTI571-0114 ($p = 0,453$).

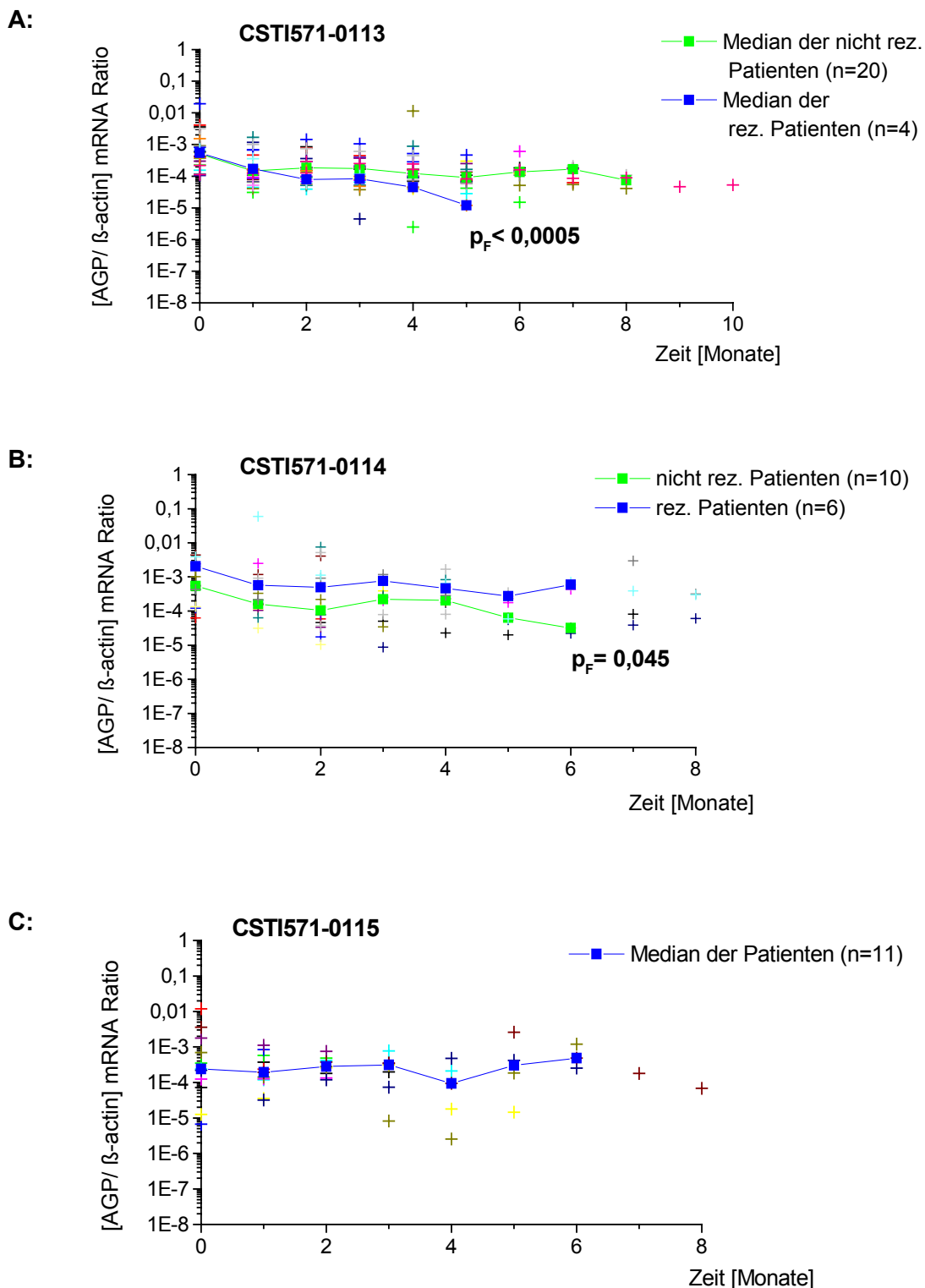


Abbildung 10. Diese Abbildung zeigt die Verläufe der medianen [AGP/ β -actin] mRNS Ratio (y-Achse, logarithmisch) für die einzelnen Studienkollektive im Verlauf der Therapie (x-Achse, linear). N ist die Anzahl der Patienten. In A und B werden die nicht rezidierten und rezidierten Patienten getrennt dargestellt.

4.3.4 WT1 mRNA Transkripte

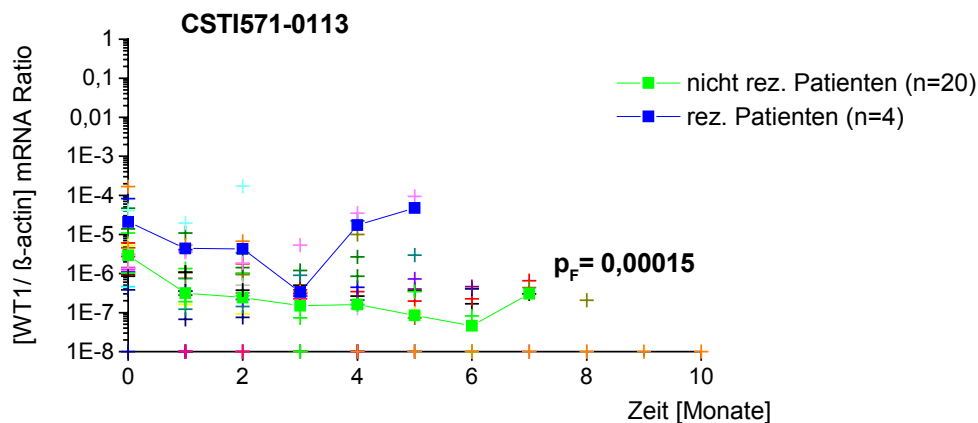
Abb. 11A, 11B und 11C zeigen die Verläufe der [WT1/ β -actin] mRNA Ratio im Verlauf der Behandlung mit Imatinib.

Für die Studien CSTI571-0113 (A) und CSTI571-0114 (B) sind die Verläufe der rezidierten (rez.) und nicht rezidierten (nicht rez.) Patienten getrennt dargestellt. Bei der Studie CSTI571-0115 (C) werden beide Gruppen zusammengefasst betrachtet. N gibt die Anzahl der Patienten in den jeweiligen Gruppen zum Zeitpunkt 0 an.

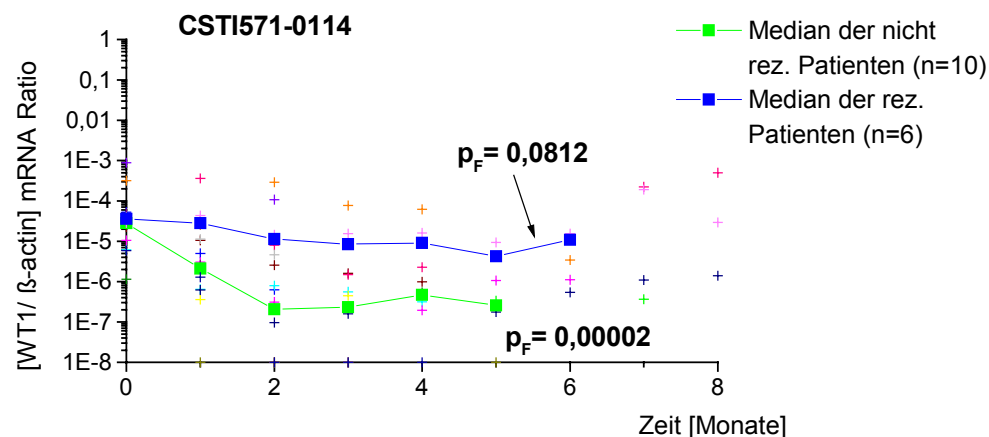
Die mediane [WT1/ β -actin] mRNA Ratio sank statistisch signifikant für die rezidierten Patienten der Studie CSTI571-0113 ($p < 0,0005$) (A) und für beide Gruppen - nicht rezidierte ($p < 0,0005$) und rezidierte ($p = 0,008$) Patienten - der Studie CSTI571-0114 (B). Im Vergleich zu den rezidierten Patienten war der Abfall der nicht rezidierten Patienten der Studie CSTI571-0114 jedoch wesentlich deutlicher: von $3,37 \times 10^{-5}$ zum Zeitpunkt 0 auf $2,31 \times 10^{-7}$ im 3. Monat. Die Medianverläufe der beiden Gruppen bezüglich der [WT1/ β -actin] mRNA Ratio unterscheiden sich signifikant ($p = 0,018$).

Die [WT1/ β -actin] mRNA Ratio in der Studie CSTI571-0115 verlief ähnlich der medianen [bcr-abl/ β -actin] mRNA Ratio. In diesem Falle ist der Abfall jedoch signifikant ($p = 0,019$) (C).

A:



B:



C:

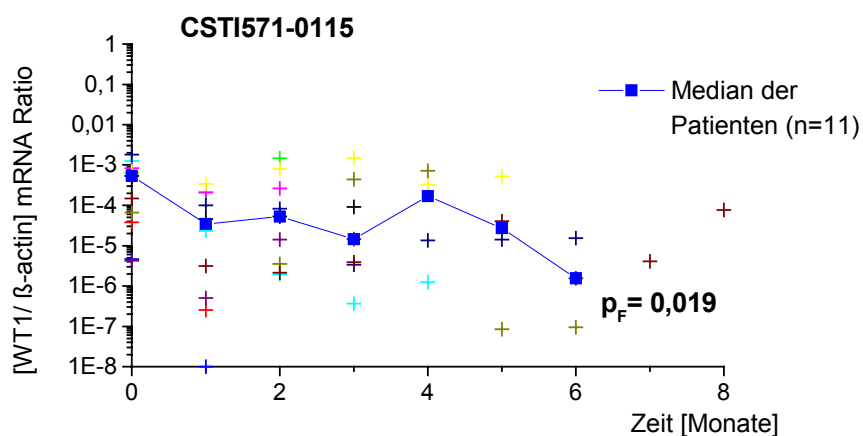


Abbildung 11. Diese Abbildung zeigt die Verläufe der medianen [WT1/β-actin] mRNS Ratio (y-Achse, logarithmisch) für die einzelnen Studienkollektive im Verlauf der Therapie (x-Achse, linear). N ist die Anzahl der Patienten.

4.3.5 MDR1 mRNS Transkripte

Abb. 12 zeigt den Verlauf der [MDR1/ β -actin] mRNS Ratio im Verlauf der Behandlung mit Imatinib für die Studien CSTI571-0113 (A) und CSTI571-0114 (B). Hierbei werden die Verläufe der rezidierten (rez.) und nicht rezidierten (nicht rez.) Patienten getrennt dargestellt. N gibt die Anzahl der Patienten in den jeweiligen Gruppen zum Zeitpunkt 0 und SD die Standardabweichung an.

In der Studie CSTI571-0115 werden nicht rezidierte und rezidierte Patienten in einem Verlauf (C) betrachtet.

Im gesamten Beobachtungszeitraum blieb die mediane [MDR1/ β -actin] mRNS Ratio in allen 3 CSTI571-Studien stabil, ohne statistisch signifikante Abfälle oder Anstiege.

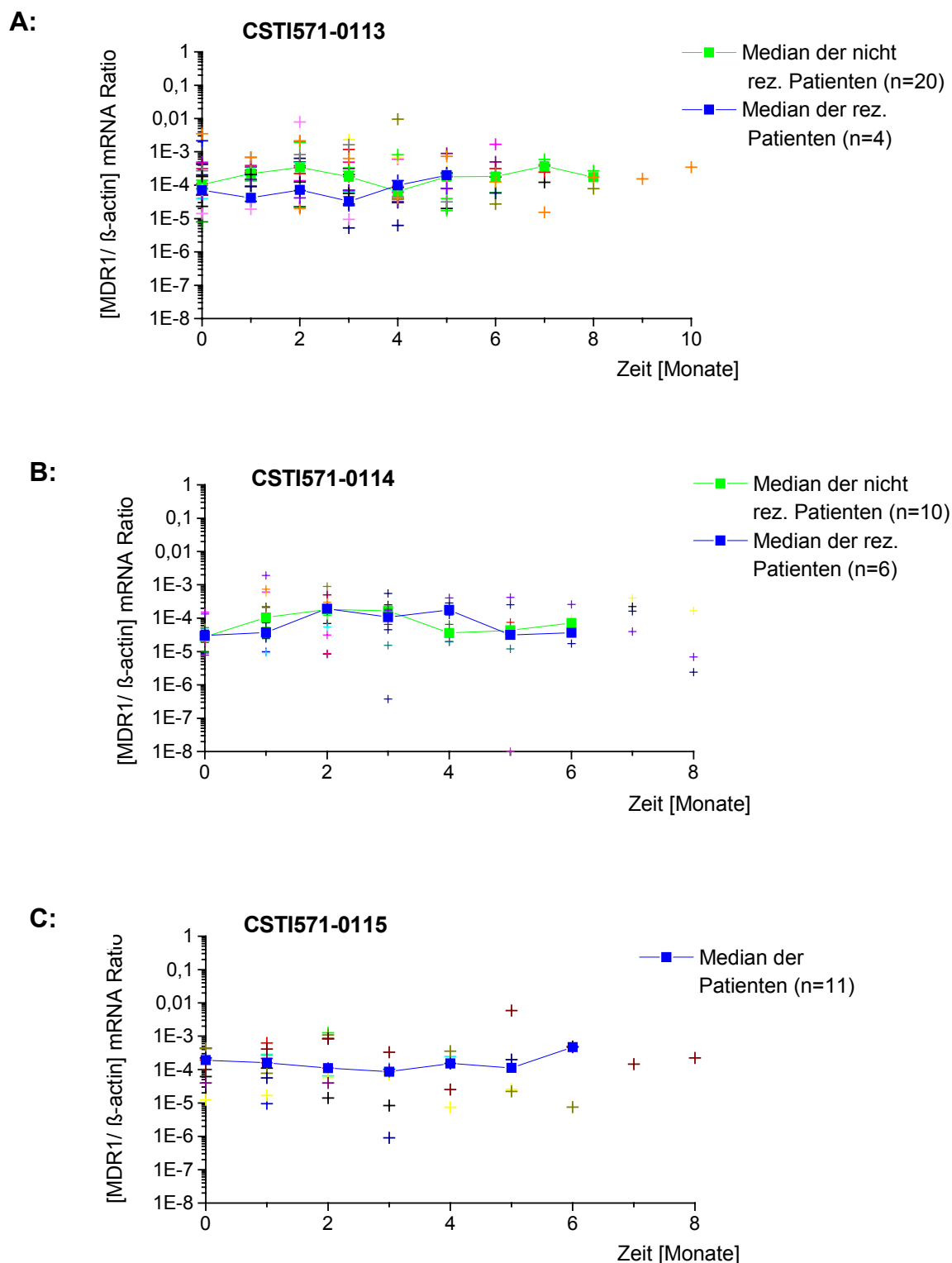


Abbildung 12. Diese Abbildung zeigt die Verläufe der medianen [MDR1/ β -actin] mRNS Ratio (y-Achse, logarhythmisch) für die einzelnen Studienkollektive im Verlauf der Therapie (x-Achse, linear). N ist die Anzahl der Patienten.

4.4 ERGEBNISSE DES CLAMPING-PROBE ASSAYS

4.4.1 Methodenevaluation

Um die Evolution oder Präexistenz von relevanten bcr-abl Mutationen zu studieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit Mutationsanalysen während des Krankheitsverlaufes durchgeführt. Zur Demonstration der Sensivität des Assays, der die PNA-Clamping PCR mit einer Mutationsanalyse kombiniert, wurden definierte Mengen an Positivkontrollenplasmid hergestellt und in Wildtyp-cDNA verdünnt. Abb. 13 stellt dar, dass Verdünnungen von 1:10 bis 1:500 mittels des PNA-Clamping Assays detektiert werden konnten.

Abb. 14A - 16A zeigen die Mutationsanalysen der für diese Arbeit untersuchten rezidierten Patienten. Parallel dazu zeigen Abb. 14B - 16B die Messungen der bcr-abl/ β -Actin mRNA Ratio während des Krankheitsverlaufes, sowie den Zeitpunkt der hämatologischen Resistenz (HR).

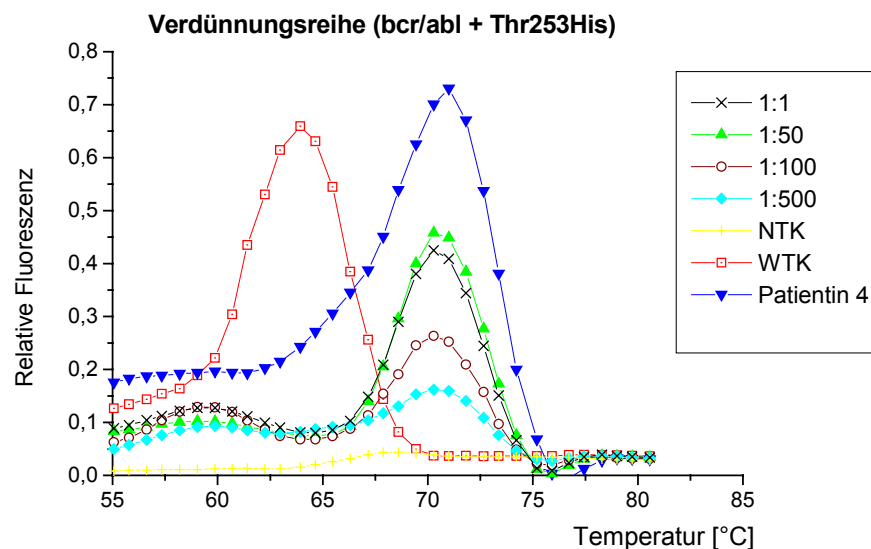


Abbildung 13. stellt die Verdünnung von Tyr253His cDNA in Wildtyp-cDNA dar. Die Tyr253His cDNA, die aus dem Blut eines Patienten synthetisiert wurde, der diese Mutation entwickelte, wurde in Wildtyp cDNA eines gesunden Spenders verdünnt und anschliessend im etablierten PNA-Clamping Assay gemessen.

NTK = non-Template-Kontrolle; WTK = Wildtyp-Kontrolle.

4.4.2 Mutationsnachweis bei therapierefraktären und rezidierten Patienten

Bei Patientin 1 handelt sich um eine 61-jährige Frau, bei der 88 Monate vor Einschluss in die Studie CSTI571-0113 CML diagnostiziert wurde. Mittels des im Rahmen dieser Arbeit etablierten PNA-Clamping Assays konnte eine Thr315Ile-Mutation in der 16.

Woche nach Therapiebeginn mit Imatinib detektiert werden (Abb. 14A). Zu einer hämatologischen Resistenz, bestätigt durch ein Ansteigen der Blasten im peripheren Blut, kam es bei dieser Patientin allerdings erst in der 24. Woche (Abb. 14B).

Bei der 67-jährigen Patientin 2 wurde die CML 11 Monate vor Einschluss in die Studie CSTI571-0115 diagnostiziert. Nach Studienbeginn detektierte man in der 6. Woche hier ebenfalls eine Thr315Ile-Mutation. Kurz darauf konnte – zwischen Woche 6 und 7 – eine hämatologische Resistenz festgestellt werden (ohne Abb.).

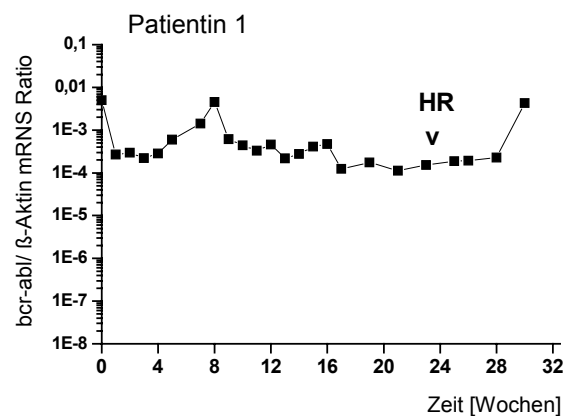
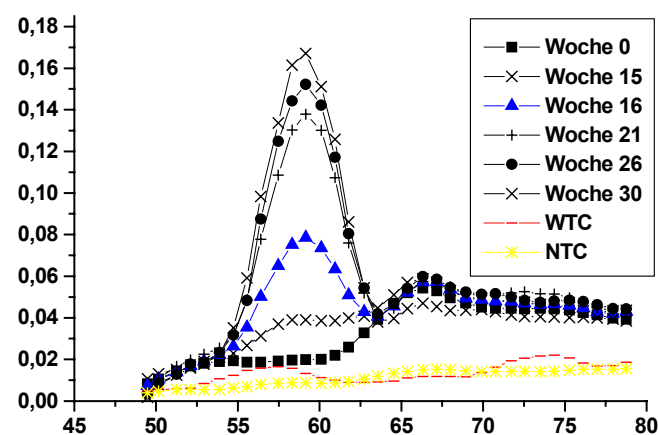
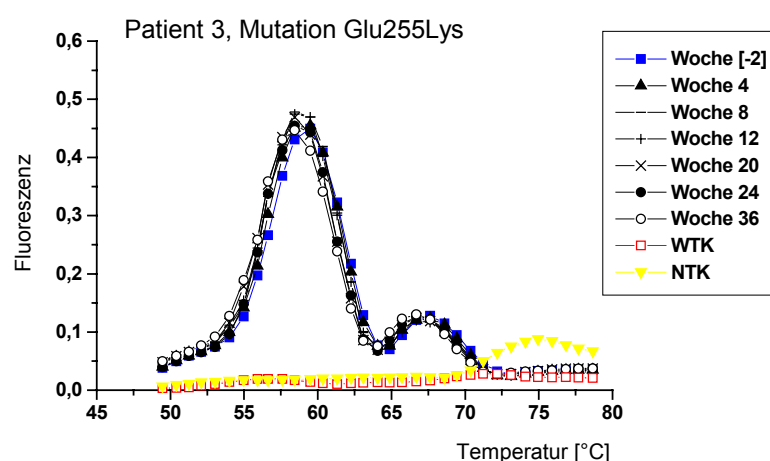


Abbildung 14. Longitudinale Messungen der detektierten Mutation Thr315Ile und der bcr-abl mRNA bei Patientin 1, die refraktär gegenüber der Imatinib-Therapie war. **A** zeigt die Schmelzkurven der cDNA, während **B** die quantitative bcr-abl Last als Ratio zwischen Ziel- und Kontroll-Template (β -Aktin) darstellt. Die Zeit der Imatinib-Therapie ist in Wochen angegeben. HR = Hämatologische Resistenz. NTK = non-Template-Kontrolle; WTK = Wildtyp-Kontrolle.

Bei Patient 3 konnte die Glu255Lys-Mutation schon vor Beginn der Imatinib-Therapie detektiert werden (Abb. 15A). Beim Einschluss in die Studie CSTI571571-0114 war der Patient 64 Jahre alt, und die CML schon seit 47 Monate bekannt. Der Patient entwickelte weder ein hämatologisches noch zytogenetisches Ansprechen, so dass nach 37 Wochen die Imatinib-Therapie beendet wurde. Die bcr-abl mRNA Kopienzahl blieb während der gesamten Behandlungsperiode erhöht (Abb. 15B).

A:



B:

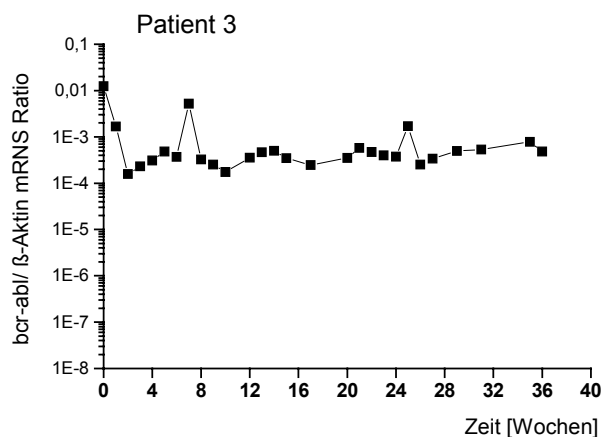
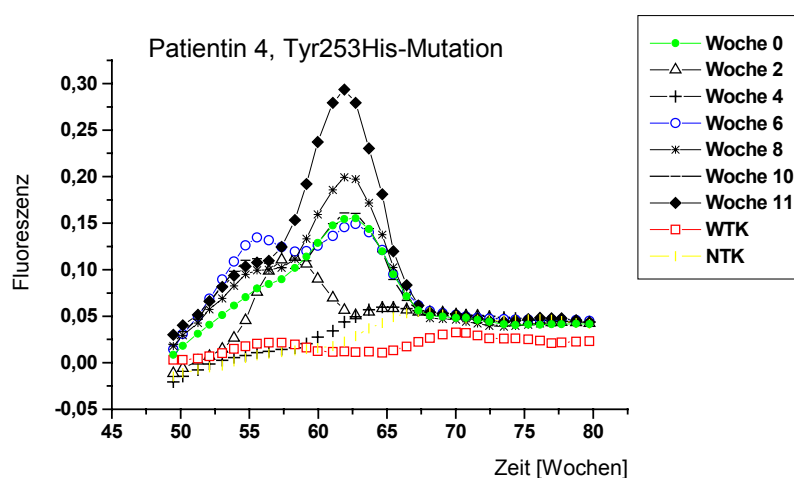


Abbildung 15. Longitudinale Messungen der detektierten Mutation Glu255Lys und der bcr-abl mRNA bei Patient 3, der refraktär gegenüber der Imatinib-Therapie war. **A** zeigt die Schmelzkurven der cDNA, während **B** die quantitative bcr-abl Last als Ratio zwischen Ziel- und Kontroll-Template (β -Aktin) darstellt. Die Zeit der Imatinib-Therapie ist in Wochen angegeben. NTK = non-Template-Kontrolle; WTK = Wildtyp-Kontrolle.

Patientin 4 wurde 82-jährig in die Studie CSTI571-0115 aufgenommen. Die CML war zu diesem Zeitpunkt bereits 32 Monate lang bekannt. Die anfangs (Woche 0) detektierbare Tyr253His-Mutation war nach Therapiebeginn mit Imatinib zunächst nicht mehr nachweisbar, trat dann aber in der sechsten Woche erneut auf (Abb. 16A). Da die Patientin zu diesem Zeitpunkt leukozytopenisch war, konnten weder hämatologische noch zytogenetische Daten über ihren Krankheitszustand erschlossen werden. Nach einem hämatologischen Rezidiv in der 10. Woche, verstarb die Patientin zwischen Woche 11 und 12 (Abb. 16B).

A:



B:

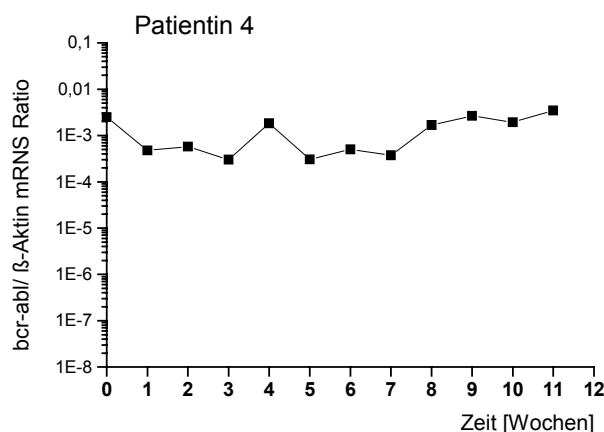


Abbildung 16. Longitudinale Messungen der detektierten Mutation Tyr253His und der bcr-abl mRNA bei Patient 4, die refraktär gegenüber der Imatinib-Therapie war. **A** zeigt die Schmelzkurven der cDNA, während **B** die quantitative bcr-abl Last als Ratio zwischen Ziel- und Kontroll-Template (β -Aktin) darstellt. Die Zeit der Imatinib-Therapie ist in Wochen angegeben. NTK = non-Template-Kontrolle; WTK = Wildtyp-Kontrolle

5 DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 69 Patienten untersucht, die als Teil einer internationalen Studie analog zu Patienten in bereits publizierten Studien behandelt wurden [60, 61, 62].

Von diesen 69 Patienten waren zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses 37 in der chronischen Phase, 21 in der akzelerierten Phase und 11 Patienten in der Blastenkrise. Klinische Daten, wie hämatologisches und zytogenetisches Ansprechen, Nebenwirkungen sowie molekularbiologische Daten wurden während des Krankheitsverlaufes erfasst. In dieser Arbeit wurden ausserdem die bcr-abl, WT1, AGP und MDR1 mRNS Verläufe gemessen, um diese als potentielle Verlaufs- oder Prognoseparameter und im Rahmen der Resistenzentstehung gegenüber Imatinib beurteilen zu können.

Den Schwerpunkt dieser Arbeit stellt die Etablierung eines PNA-Clamping Assay dar, der ein Screening rezidivierter Patienten auf drei bekannte Mutationen (Thr315Ile, Glu255Lys, Tyr253His) ermöglichte. Aufgrund einer Sensivität des Assays von 1:500 konnte eine Mutation frühzeitig und vor dem hämatologischen Rezidiv detektiert werden.

5.1 METHODENDISKUSSION

Im Rahmen der Methodendiskussion werden zwei Punkte betrachtet. Dabei handelt es sich a) um den Vergleich Taqman versus Lightcycler, und b) um den Vergleich des PNA-Clamping gegenüber standardisierten Methoden.

Die molekularbiologischen Daten wurden durch Echtzeitfluoreszenz-PCR mit Hilfe des Taqman erfasst, was gegenüber anderen quantitativen PCR-Verfahren den Vorteil einer automatisierten und damit schnellen Durchführung hat. Bei einer gleichzeitigen Messung von 96 Proben im Taqman ermöglichen lineare Standardkurven von 107 bis 101 Kopien die Bestimmung absoluter Templatmengen. Ausserdem kommt es durch die Detektion von PCR-Produkten im geschlossenen Gefäss und Fehlen von post-PCR-Schritten zur Senkung der Kontaminationsgefahr.

Eine hohe Präzision der Ergebnisse wird durch das Erfassen der Kopienzahl der Gensequenz in der exponentiellen Phase der Reaktion erzielt. Eine gute Korrelation ist

ein Indikator für die Messgenauigkeit. Diese Korrelation lag in allen Messungen bei 0.997 bzw. 0.998 lag (Abb.8).

Ergebnisse für eine quantitative Echtzeitfluoreszenz-PCR im Lightcycler liegen bereits nach ca. einer Stunde vor. Im Lightcycler können maximal 45 Proben gleichzeitig gemessen werden. Im Taqman können dagegen 96 Proben in einem PCR-Lauf gemessen werden und es wird – anstatt der fragilen Glaskapillaren im Lightcycler – eine stabilere Polyethylengefäßplatte verwendet. In Abhängigkeit zu den PCR-Konditionen kann ein PCR-Lauf im Taqman allerdings bis zu zwei Stunden und länger dauern. Da die Erfassung der mRNS-Daten in dieser Arbeit jedoch retrospektiv erfolgte und keine klinischen Entscheidungen zur Folge hatte, spielte der Zeitfaktor in diesem Falle nur eine untergeordnete Rolle. Bei einer Detektionsgrenze von 10 Kopien konnten durch das Verfahren der Echtzeitfluoreszenz-PCR insgesamt valide und reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden.

Limitiert ist dieses Verfahren – unabhängig vom eingesetzten Gerät – zum einen durch den apparativen Aufwand und zum anderen durch die mangelnde Sensivität im Vergleich zur nested-PCR.

Des Weiteren musste im Rahmen dieser Arbeit eine externe Referenz verwendet werden, da für das Referenzgen β -Actin die PCR separat und nicht gleichzeitig mit der PCR des Zielgens als interne Referenz durchgeführt werden musste. Eine interne Referenz wäre nur über eine Duplex-PCR möglich gewesen, die zum Zeitpunkt der Messung aber nicht verfügbar war.

Aktuelle Detektionstechniken für Sequenzvariationen, wie Einzelstrang-Konformationspolymorphismus, DNS-Sequenzierung oder Echtzeitfluoreszenz-PCR haben eine limitierte Sensivität von ungefähr 1:5 (20%) [87]. Bezüglich eines Restriktionslängenpolymorphismus kann in Abhängigkeit vom Sequenzcharakter keine Sensivität unter 1:10 (10%) erzielt werden [116]. Assays mit einer grösseren Sensivität, wie sie bei Pourzand et al. (1993) und van Houten et al. (2000) aufgeführt werden, sind methodisch wesentlich komplizierter und zum Teil auch nur bedingt reproduzierbar [117, 118]. Eine hohe Sensivität ist vor allem relevant bei relativ hohem Hintergrund an Wildtyp-Molekülen, wie z.B. nicht-mutiertes bcr-abl im Falle von Punktmutationen, die zur Imatinib-Resistenz führen.

Bei Nutzung von fluoreszenzmarkierten Hybridisierungsproben in der Echtzeitfluoreszenz-PCR können Variationen auf Einzelbasenpaarebene speziell durch Schmelzkurven analysiert werden. Um zuverlässige und sensitive Informationen über kleinste Mengen an mutierten Zellen nachzuweisen, können zusätzlich einzelne Klone gepickt und anschliessend deren DNS sequenziert werden.

Im Gegensatz zu den oben genannten arbeits- und zeitintensiven Prozeduren, wurde in der hier vorgestellten Arbeit die wesentlich weniger arbeits- und zeitintensive Methode des PNA-Clamping Assays etabliert und zur Detektion relevanter Mutationen der Imatinibresistenz angewandt. Bei diesem Assay handelt es sich um eine Kombination aus PNA-Clamping-PCR und einer Mutationsanalyse mit zwei fluoreszenzmarkierten Sonden.

Ein Assay dieser Art wurde bisher lediglich für Mutationen des Hämatochromatosegens und im Rahmen von c-kit Mutationen publiziert, wobei jedoch genauere Angaben bezüglich der Sensivität der angewandten Assays fehlten [44]. Sotlar et al. (2003) geben für einen solchen Assay zur Detektion von c-kit Mutationen eine Sensivität von 1:1000 (0,1%) an [119]. Es handelt sich hierbei um eine schnelle Technik mit einer Sensivität von 1:500 (0,2%), die 20 Minuten nach DNS-Präparation durchgeführt werden kann und sich deshalb zur Routinediagnostik eignen könnte. In einer von Roche-Lestienne et al. (2002) erschienenen Publikation wurden zur Detektion von bcr-abl Mutationen Allel-spezifische Primer verwandt. Die Autoren beschreiben hier eine Sensivität von 1:10000 [93]. Es ist jedoch zu bedenken, dass es bei dieser Methode leicht zu falsch-positiven Ergebnissen kommen kann, weil schon allein eine nicht-adäquate Primerhybridisation die Ursache für artifizielle Template sein kann.

Im PNA-Clamping Assay dieser Arbeit wurden keine Allel-spezifischen Primer verwendet. Aufgrund der PNA-Clamping-PCR konnte das mutierte Allel selektiv amplifiziert und durch seine spezifische Schmelzkurve einfach charakterisiert werden. Zusätzlich erfüllt der Assay das sogenannte Format des geschlossenen Gefässes.

Ein Schwachpunkt dieser Technik ist jedoch, dass der Allel-Status der amplifizierten PCR-Produkte nicht unterschieden werden kann.

5.2 AUSWERTUNG UND VERGLEICH DER STUDIEN CSTI571-0113/ -0114/ -0115

In dieser Arbeit wurden nicht alle Patienten analysiert, die am Campus Virchow, Charité rekrutiert worden waren. Ausgeschlossen wurden Patienten, bei denen Daten aufgrund von Non-Compliance fehlten oder die weniger als vier Wochen behandelt worden sind. Im Vergleich zu analog behandelten Patienten in bereits publizierten Studien war die Beobachtungszeit der in dieser Arbeit vorgestellten Patienten kürzer und eine Einjahresüberlebensrate konnte nicht bestimmt werden, da die mittlere Beobachtungsrate bei weniger als einem Jahr lag [60, 61, 62]. Rezidive, die eventuell erst nach Ende des Beobachtungszeitraum auftraten, gingen nicht in die Beurteilung mit ein. Diese Gründe könnten dazu beigetragen haben, dass es im Vergleich zu den bereits publizierten Studien zu geringen Abweichungen der klinischen Ergebnisse kam. Bezüglich der zytogenetischen Ergebnisse sind direkte Vergleiche nicht möglich, da sich der Zeitpunkt der Knochenmarkspunktionen im Rahmen der Studien unterschied. Trotz fehlender direkter Vergleichbarkeit sind die Unterschiede der klinischen Ergebnisse der Studien nicht von solchem Umfang, dass generell andere Schlussfolgerungen aus den vorliegenden Ergebnissen gezogen werden müssen.

5.2.1 Hämatologische und zytogenetische Daten der Studie CSTI571-0113

In der Studie CSTI571-0113 führte Imatinib bei 83,8 % der Patienten zu einer kompletten hämatologischen Remission. Dieses Ergebnis unterscheidet sich geringfügig von der Studie von Kantarjian et al (2002), in der Imatinib bei 91% der Patienten zu einer kompletten hämatologischen Remission führte.

In dieser Studie hatten 46,2% der chronische Phase Patienten ein major zytogenetisches Ansprechen nach 3 Monaten, 87,5% nach 6 Monaten und 33,3% nach 9 Monaten. Die unterschiedlichen zytogenetischen Ansprechraten nach 3, 6 bzw. 9 Monaten sind unter anderem durch die unterschiedlichen Patientenzahlen zu diesen Zeitpunkten zu erklären.

Insgesamt lagen bei 23 Patienten der hier untersuchten Patienten suffiziente zytogenetische Analysen (≥ 20 Metaphasen) vor. Neun Patienten (39,1%) entwickelten ein major zytogenetisches Ansprechen innerhalb von 9 Monaten. Nach einer mittleren Beobachtungsdauer von 26 Wochen lag die Überlebensrate der Patienten bei 91,9%

(vergl. Tab. 17). Bei Kantarjian et al. (2002) hatten 60% der Patienten ein zytogenetisches Ansprechen, und die Überlebensrate nach 18 Monaten betrug 95%.

Somit zeigt sich zusammenfassend für die, bei Kantarjian et al. und die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patienten, ein besseres zytogenetisches Ansprechen als im Falle einer Behandlung mit IFN α .

5.2.2 Hämatologische und zytogenetische Daten der Studie CSTI571-0114

Im Gegensatz zu 34% in der publizierten Studie von Talpaz et al. (2002) kam es in der hier vorgestellten Patientengruppe bei 71,4% der Patienten zu einer kompletten hämatologischen Remission.

Talpaz et al. (2002) berichten ausserdem von einem major zytogenetischem Ansprechen bei 24% der Patienten. Die mittlere Ansprechzeit lag dabei zwischen zwei und drei Monaten, aber selbst noch nach 12 Monaten entwickelten Patienten ein major zytogenetisches Ansprechen.

Demgegenüber hatten in der hier vorliegenden Arbeit nach 3 Monaten 33,3% der Patienten und nach 6 Monaten 25% der Patienten ein major zytogenetisches Ansprechen. Nach 9 Monaten gab es kein major zytogenetisches Ansprechen bei Patienten mit 20 auswertbaren Metaphasen. Allerdings lagen bei etlichen Patienten zu diesem Zeitpunkt keine auswertbaren Knochenaspirate vor. Nur ein Patient (33,3%) mit 10 analysierbaren Metaphasen zeigte ein major zytogenetisches Ansprechen. Von 15 auswertbaren Patienten entwickelten 2 Patienten (13,3%) ein major zytogenetisches Ansprechen (≥ 20 Metaphasen) (siehe Tab. 18).

Nach dem Studienprotokoll wurden in die Studie CSTI571-0114 auch Patienten eingeschlossen, die allein aufgrund chromosomaler Aberrationen in die akzelerierte Phase eingeordnet wurden, ohne dass signifikante Blutbildveränderungen mit erhöhten Blasten- und Promyelozytenanteilen vorlagen. In den grossen Studien [60, 61, 62] wurden diese Patienten häufig als chronische Phase Patienten eingestuft. Dieser Unterschied ist als Erklärung für bessere hämatologische und zytogenetische Ergebnisse in der hier vorgestellten Studie CSTI571-0114 möglich. Nach einer mittleren Beobachtungszeit von 24 Wochen überlebten insgesamt 87,5% der Patienten. Bei Talpaz et al. (2002) lag die mittlere Einjahresüberlebensrate bei 74%.

5.2.3 Hämatologische und zytogenetische Daten der Studie CSTI571-0115

Bei 7 (63,6%) der hier insgesamt 11 untersuchten Patienten der Studie CSTI571-0115 kam es zu einem kompletten hämatologischen Ansprechen. In der Arbeit von Sawyers et al (2002) wurde vergleichsweise von einem kompletten hämatologischen Ansprechen bei 7% der Patienten berichtet. Erneut muss jedoch auf die grosse Diskrepanz der jeweiligen Patientenzahlen hingewiesen werden.

Ein Patient der in dieser Arbeit untersuchten Patienten in Blastenkrise hatte bei 10 auswertbaren Metaphasen ein major zytogenetisches Ansprechen.

Im gesamten Untersuchungszeitraum konnte in der Mehrheit der Fälle keine suffiziente zytogenetische Analyse (≥ 20 Metaphasen) durchgeführt werden. Sechs Patienten (54,5%) verstarben nach einer mittleren Beobachtungszeit von 19 Wochen (siehe Tab. 19). Sawyers et al. (2002) berichteten von einer mittleren Einjahres-Überlebensrate von 32% [62]. Aufgrund der geringen Fallzahl unserer Studie ist ein aussagekräftiger Vergleich mit den Daten von Sawyers et al (2002) nicht möglich.

5.2.4 Nebenwirkungen

Im Vergleich zu IFN α traten während der Behandlung mit Imatinib insgesamt weniger Nebenwirkungen auf (siehe Tab. 20). Nach den allgemeinen Kriterien des National Cancer Institute [114] handelte es sich hauptsächlich um Nebenwirkungen vom Grad I oder Grad II. Die wesentlichen nicht hämatologischen Nebenwirkungen in allen drei Studien stellten oberflächliche Ödeme (vor allem Periorbitalödeme), Muskelkrämpfe, Exantheme und Gewichtszunahme dar. Diese Nebenwirkungen sind relativ übereinstimmend auch in anderen Studien beschrieben worden [58, 59, 60, 61, 62]. Die Inzidenz der einzelnen Nebenwirkungen ist im Vergleich zu bereits veröffentlichten Daten allerdings geringer und könnte mit der kürzeren Behandlungsdauer der Patienten in der vorliegenden Arbeit erklärt werden.

Im Vergleich zu den entsprechenden publizierten Studien kam es bei den hier vorgestellten Patientengruppen zu mehr hämatologischen Toxizitäten (siehe Tab. 20). Interessanterweise kam es bei den Knochenmarkspunktionen nach Therapiebeginn zum gehäuften Auftreten von hypozellulären – und daher für die zytogenetische Untersuchung inadäquaten – Proben. Diese Beobachtung könnte durch einen bis dato noch nicht eindeutig geklärten Effekt von Imatinib auf die Ph-Chromosom negative

Granulopoese erklärt werden. Einige Autoren schreiben dem c-abl eine Beteiligung an zellregulatorischen Funktionen wie DNS-Reparaturmechanismus und Zelldifferenzierung zu [120]. Imatinib könnte demnach über Inhibition des c-abl die Proliferation der bcr-abl negativen „Resthämatopoese“ beeinflussen.

Bei den nicht hämatologischen Toxizitäten sind die Entstehungsmechanismen noch nicht vollständig geklärt. Dies gilt insbesondere für Muskelkrämpfe, Nausea und Gewichtszunahme.

Lediglich die dermatologischen Toxizitäten wie z.B. Wundheilungsstörungen oder Dermatiden könnten erklärt werden mit einer Inhibition des PDGF-R β durch Imatinib in Zusammenhang stehen. Diese Überlegung ergibt sich aus der Beobachtung, dass der PDGF-R an regenerativen Funktionen wie Wundheilung beteiligt ist [121].

5.3 α_1 -SAURES-GLYKOPROTEIN (AGP): PROTEINCHEMISCHE UND MOLEKULARBIOLOGISCHE VERLÄUFE

Trotz viel versprechender Studienergebnisse in der Behandlung mit Imatinib stellt das Auftreten von Resistenzen gegenüber Imatinib ein zentrales Problem der klinischen Anwendung dar. In Zellkulturexperimenten konnte bereits im Jahr 2000 die Amplifikation des bcr-abl Fusionstranskriptes als ein möglicher Resistenzmechanismus beschrieben werden [64, 65, 66]. Spätere Arbeiten zeigten, dass dieser Mechanismus durchaus eine klinische Relevanz hat [67].

Während jedoch eine Dosissteigerung im Zellkulturansatz zu einer erneuten Sensitivität der Zellen gegenüber Imatinib führte, kann eine Dosissteigerung im klinischen Einsatz die Resistenz nicht in allen Fällen überwinden. In diesem Falle könnte von Bedeutung sein, dass Imatinib im klinischen Ansatz zu 95% an Plasmaeiweiss gebunden ist, und eine Erhöhung der oralen Dosis keinen linearen Anstieg der freien und aktiven Plasmakonzentration zur Folge hat. Bei den hier untersuchten Patienten wurde im Rezidiv in Einzelfällen Amplifikationen des Ph-Chromosoms beschrieben.

Experimentelle Daten zu AGP in Zusammenhang zur Resistenzentwicklung gegenüber Imatinib wurden aus in vitro-Versuchen und Tiermodellen hergeleitet, eine klinische Relevanz ist noch nicht demonstriert worden. Kokultivierung von BCR-ABL positiven Zelllinien im Patientenserum mit niedrigen und hohen Konzentrationen an AGP zeigte jedoch eine dosisabhängige Inhibition von Imatinib [122].

In diesem Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl der Plasmaproteinspiegel des AGP (siehe Abb. 7A-C) wie auch die AGP mRNA-Transkriptzahlen im Verlauf bestimmt (siehe Abb. 10A-C).

Der Normbereich bei Gesunden für AGP liegt zwischen 50 und 120 g/dl. In Abhängigkeit des Krankheitsstadiums steigt die AGP Plasmakonzentration. Patienten mit Rezidiv wiesen initial – im Vergleich zu Patienten im gleichen Krankheitsstadium ohne Rezidiv – höhere AGP Plasmaspiegel auf [112, 123]. Auch in dem geringfügig modifizierten Patientenkollektiv dieser Arbeit wurden diese Ergebnisse bestätigt. Für die Studie CSTI571-0113 (7A) war der mediane AGP Plasmaproteinwert in der Woche 0 für die Patienten ohne Rezidiv 96,0 g/dl, für die Patienten mit Rezidiv dagegen 148,5 g/d. Der mediane AGP Plasmaproteinwert der rezidierten Patienten der Studie CSTI571-0114 (7B) lag mit 179,5 g/dl ebenfalls höher als in der Gruppe der nicht rezidierten Patienten mit 141,0 g/dl. Für die Gruppe CSTI571-0115 (7C) ergab sich mit 183,5 g/dl der höchste mediane AGP Plasmaproteinwert in der Woche 0.

Zusammenfassend lagen die medianen AGP Plasmaproteinwerte für die rezidierten Patienten in der Woche 0 ausserhalb des Normbereiches und höher als für die nicht rezidierten Patienten. In Abhängigkeit des Krankheitsstadiums stieg der initiale AGP Plasmaproteinwert vor Therapiebeginn mit Imatinib von der chronischen Phase zur Blastenkrise an.

Während des gesamten Beobachtungszeitraums kam es für die nicht rezidierten Patienten der Studie CSTI571-0114 ($p=0,007$) und für die Patienten der Studie CSTI571-0115 ($p=0,051$) zu einem statistisch signifikanten Abfall des Plasma-AGP-Spiegels.

AGP ist ein in der Leber synthetisiertes akute-Phase-Protein. Auf die Frage, inwieweit AGP überhaupt in peripheren Blutzellen exprimiert wird, zeigten le Coutre et al. (2002) zunächst, dass AGP mRNA in den peripheren Blutzellen von Patienten nachweisbar ist. Leukämische Blasten werden jedoch als Ursprung für die AGP mRNA-Synthese ausgeschlossen [112].

Gahmberg et al. gehen davon aus, dass AGP in den Lymphozyten synthetisiert wird [124]. Trotz der Theorie eines „shedding“ von AGP mRNA, einem Ausschwemmen von AGP mRNA aus der Leber in die Blutbahn, kann der Ursprung der AGP mRNA im Blut letztendlich nicht bestätigt werden.

Teilweise handelte es sich bei den in vergleichbaren Arbeiten untersuchten Patienten um Studienpatienten, die auch in dieser Arbeit beschrieben wurden. Die AGP mRNA-Spiegel der Patienten aus der Arbeit von Le Coutre et al. (2002) wurden im Rahmen dieser Arbeit im Krankheitsverlauf weiterverfolgt.

Die [AGP/ β -actin] mRNA Ratio in der Studie CSTI571-0113 verändert sich im Beobachtungszeitraum nur für die Gruppe der rezidierten Patienten signifikant

($p < 0,0005$), wobei die Ratio um mehr als eine logarithmische Stufe sinkt (siehe Abb. 10A). In der Studie CSTI571-0114 dagegen ist es die Ratio der nicht rezidierten Patienten, die signifikant von $5,65 \times 10^{-4}$ auf $2,04 \times 10^{-4}$ abfällt ($p = 0,045$) (siehe Abb. 10B). Die Ratio für die gesamten Patienten der Studie CST571-0115 (siehe Abb. 10C) blieb relativ stabil. Aufgrund dieser diskordanten Ergebnisse kann der detektierten AGP mRNA in dieser Arbeit bezüglich einer Rezidiventwicklung keine biologische Relevanz beigemessen werden. Le Coutre et al. (2002) kamen nach 13-wöchiger Verlaufsbeobachtung zu demselben Ergebnis.

Der Unterschied zwischen mRNA-Expression im peripheren Blut und den gemessenen AGP Proteinwerten könnte somit einerseits dadurch erklärt werden, dass Veränderungen des AGP Plasmaspiegels allein auf Veränderungen der hepatischen AGP mRNA zurückgehen, ohne in Verbindung mit der AGP mRNA im Plasma zu stehen. Andererseits könnten auch, dass posttranslationale Mechanismen unter Imatinib-Therapie so beeinflusst werden, dass erhöhte AGP Protein-Spiegel reduziert werden.

5.4 DISKUSSION DER BCR-ABL, WT1 und MDR1 mRNA DATEN

Bereits seit 1999 ist in unserer Arbeitsgruppe die quantitative PCR für bcr-abl sowohl im Lightcycler als auch im Taqman etabliert. In Vorarbeiten konnte an Leukämiepatienten festgestellt werden, dass in einer Echtzeitfluoreszenz-PCR bcr-abl und WT1 mRNA-Spiegel mit dem klinischen Verlauf und den molekularbiologischen Ergebnissen, die in einem konventionellen PCR-Verfahren erschlossen wurden, korrelieren [99, 111, 125]. Gleichzeitig kann davon ausgegangen werden, dass die quantitative mRNA-Bestimmung dieser beiden Parameter prädiktiven Wert hat und als neuer Marker bei der Detektion von Minimal Residual Disease (MRD) Verwendung finden könnte [126].

In der vorliegenden Arbeit lagen molekularbiologische Daten von 24 Patienten in chronischer Phase vor.

Bei den nicht rezidierten Patienten in chronischer Phase kam es zu einer signifikanten Reduktion der medianen [bcr-abl/ β -actin] mRNS Ratio im Verlauf von 8 Monaten um ca. 2 logarhythmische Stufen von $4,3 \times 10^{-4}$ auf $9,3 \times 10^{-6}$ ($p < 0,0005$). Im Vergleich dazu zeigte sich bei den rezidierten Patienten ($n=4$) ein Anstieg von $8,1 \times 10^{-4}$ bis $2,3 \times 10^{-3}$. Dieser Anstieg war im Einzelfall jeweils vor dem Eintreten des hämatologischen Rezidivs erkennbar. Die Ratio in der Woche 0 lag im Median mit $2,1 \times 10^{-5}$ für die rezidierten Patienten höher als für die nicht rezidierten Patienten mit einer Ratio von $2,9 \times 10^{-6}$. Diese Ergebnisse unterstützen die prädiktive Relevanz der quantitativen bcr-abl Analyse (siehe Abb. 9A).

In der Studie CSTI571-0114 sinkt die mediane [bcr-abl/ β -actin] mRNS Ratio ebenfalls signifikant in der Gruppe der nicht rezidierten Patienten ($p=0,0368$). Lediglich eine Patientin zeigte ein komplettes molekulares Ansprechen im Sinne einer [bcr-abl/ β -actin] mRNS Ratios von 10^{-8} nach 5 monatiger Therapie mit Imatinib (siehe Abb. 9B). Diese Patientin hatte bei Therapiebeginn keine zusätzlichen chronischen Aberrationen. Sie wurde allein aufgrund von 25% Promyelozyten als akzelerierte Phase Patient rekrutiert. Es ist insofern von einer frühen akzelerierten Phase auszugehen.

Da 10 von insgesamt 11 Patienten in der Studie CSTI571-0115 rezidierten, wurde bei der Analyse der Patienten in Blastenkrise auf eine Teilung zwischen rezidiert und nicht rezidiert verzichtet. Die Ratio aus [bcr-abl/ β -actin] mRNS in der Studie CSTI571-0115 ist durch ein Ab- und Ansteigen charakterisiert (siehe Abb. 9C). Das effektivste molekulare Ergebnis bei einem Patienten in dieser Gruppe besteht in einer Reduktion der medianen [bcr-abl/ β -actin] mRNS Ratio um zwei Logstufen in einem Zeitraum von vier Monaten mit einem anschliessenden rapiden Wiederanstieg (siehe Abb.9C).

Die Funktion des WT1 besteht in der transkriptionellen Regulation, abhängig vom zellulären Kontext, dem Zielpromotor und der WT1 Isoform. Als Zielgene wurden bislang u.a. epidermal growth factor-1 (EGF-1) [103], platelet derived growth factor (PDGFR-A) [127], retinoic acid receptor-alpha (RAR-alpha) [105], bcl-2 und c-myc [106] sowie p53 [107] identifiziert. Die physiologische und pathologische Bedeutung ist bislang jedoch noch ungeklärt. Aufgrund der höheren WT1 Expression in den unterschiedlichen Leukämietypen (40-70% bei AML, 20-40% bei ALL, 80% bei CML in Blastenkrise) bietet sich WT1 ebenfalls als zusätzlichen Minimal-Residual-Disease (MRD)-Parameter an bei der CML an.

Es zeigte sich, dass in bestimmten Leukämien WT1 überexprimiert wird und WT1 Transkripte vor allem in Zellen leukämischen Ursprungs stark erhöht sind [109]. Eine solche Expression von WT1 in den peripheren Blutzellen der Studienpatienten dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden. In der Gruppe der Studie CSTI571-0113 kam es in Übereinstimmung mit der medianen [bcr-abl/ β -actin] mRNA Ratio in der Gruppe der nicht rezidierten Patienten zu einem signifikanten Abfall der medianen [WT1/ β -actin] mRNA Ratio von $2,9 \times 10^{-6}$ in der Woche 0 bis zu $4,6 \times 10^{-8}$ im 6. Monat ($p < 0,0005$). Demgegenüber zeigte sich in der Gruppe der rezidierten Patienten, ausgehend von $2,9 \times 10^{-6}$ in der Woche 0, nach kurzweiligen Absinken auf $3,3 \times 10^{-7}$ im dritten Monat ein sukzessiver Anstieg auf $4,8 \times 10^{-5}$ im 5. Monat (Abb. 11A).

In der Gruppe der Patienten in akzelerierter Phase sank die mediane [WT1/ β -actin] mRNA Ratio signifikant für die rezidierten ($p = 0,008$) und nicht rezidierten ($p < 0,0005$) Patienten. Der Abfall in der Gruppe der nicht rezidierten Patienten war im Vergleich zu den rezidierten Patienten jedoch wesentlich deutlicher. Ein statistisch signifikanter Unterschied ergab sich auch im direkten Vergleich der beiden Gruppen ($p = 0,018$) (Abb. 11B).

In Übereinstimmung mit den Daten der chronischen Phase kam es in der Blastenkrise zu einem ähnlichen Verhalten der medianen [bcr-abl/ β -actin] mRNA Ratio und medianen [WT1/ β -actin] mRNA Ratio (Abb. 9, 11C). Statistisch signifikant war jedoch nur der Abfall für WT1 ($p = 0,019$) (11C).

In diesem Sinne ist in den hier untersuchten Blastenkrisepatienten WT1 ein sensitiverer Verlaufsparemeter.

In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass die WT1 Transkriptzahlen vom Krankheitsverlauf abhängen und sich somit zum Monitoring von CML Patienten eignen. Ein Ansprechen auf eine Therapie mit Imatinib kann somit auch für CML-Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung beurteilt werden.

In der Frage möglicher intrinsischer Resistenzmechanismen wird eine MDR1 Überexpression diskutiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei allen Patienten die MDR1 mRNA Expression im Verlauf der Krankheit bestimmt. Im Gegensatz zu den variablen bcr-abl bzw. WT1 Transkriptverläufen blieben die MDR1 Transkriptzahlen in allen drei Studien während des gesamten Beobachtungszeitraumes stabil. Selbst die

Patienten in der Studie CSTI571-0115 zeigten im Vergleich zu den Patienten in den Studien CSTI571-0113 und CSTI571-0114 keine gesteigerte MDR1 mRNA Expression (siehe Abb. 12A-C). Basierend auf den in dieser Arbeit erzielten, molekularbiologischen Daten besteht bezüglich der Frage der Resistenzentwicklung gegenüber Imatinib kein Anhaltspunkt für eine MDR1 Beteiligung. Es muss dabei jedoch berücksichtigt werden, dass die Konzentration des Korrelats auf Proteinebene, dem MDR1 Protein, in dieser Arbeit nicht bestimmt worden ist. Eine erhöhte MDR1 Proteinsynthese bei konstanter MDR1 Expression z.B. durch veränderte Proteindegradation kann demnach nicht ausgeschlossen werden.

Interessanterweise gibt es in verschiedenen Publikationen unterschiedliche Daten hinsichtlich einer MDR1 Proteinexpression bei CML-Patienten, welche in einzelnen Fällen eine stadienabhängige Überexpression zeigen. Gleichzeitig und im Gegenteil berichten andere Autoren jedoch von keiner Veränderung der Expression in Abhängigkeit zu den Krankheitsstadien [128].

Die unterschiedlichen Daten bezüglich einer MDR1 Proteinexpression könnten auf verschiedene Sensitivitäten der benutzten Methoden zurückzuführen sein, die zur Detektion und Quantifizierung von MDR1 Protein verwendet wurden.

Bemerkenswert ist dennoch, dass eine bcr-abl positive Zelllinie beschrieben wurde, die aufgrund einer MDR1 Überexpression resistent gegenüber Imatinib ist [129, 130]. Weiterhin konnten Dai et al. (2003) zeigen, dass die in vitro-Gabe des MDR1 Proteininhibitors LY335979 zu einer veränderten intrazellulären Imatinibkonzentration führt [131]. Diese neueren Daten müssen als indirekter Hinweis auf eine Beteiligung des MDR1/ MDR1 Protein an der Entstehung von Resistenzmechanismen verstanden werden.

Als letzter möglicher intrinsischer Resistenzmechanismus, der in dieser Arbeit untersucht wurde, steht das Auftreten von Punktmutationen.

5.5 DISKUSSION DER DATEN DES PNA-CLAMPING ASSAYS

Die Entwicklung resistenter Klone stellt bei Patienten, die mit Imatinib therapiert werden, ein zentrales Problem dar. Hierbei ist von Bedeutung, dass aufgrund einer zu geringen Sensitivität der konventionellen Techniken Imatinib-resistente Klone nicht früh genug erkannt werden können. Des Weiteren könnte der Selektionsdruck einer

weiterführenden Imatinib-Therapie das Auftreten von resistenten Zellen beschleunigen. Eine frühe Detektion von Punktmutationen durch den hier vorgestellten PNA-Clamping Assay könnte daher zu verbesserten Therapieentscheidungen führen. Eine Relevanz dieses Ansatzes konnte im Rahmen dieser Arbeit an vier Patienten gezeigt werden.

Bei Patient 1 zeigte sich anfangs ein Rückgang der bcr-abl mRNS Last. Im weiteren Verlauf entwickelte sich jedoch ein mutierter Klon, der acht Wochen vor Eintreten des hämatologischen Rezidives durch den PNA-Clamping Assay PNA-Clamping Assay detektiert werden konnte (siehe Abb.14A-B).

Bei den Patienten 2 und 4 erfolgte ein Krankheitsprogress unmittelbar nach Detektion der Mutation. Eine Begründung für den kurzen Zeitraum zwischen diesen beiden Ereignissen könnte sein, dass sich beide Patienten zu Beginn der Therapie mit Imatinib schon in der Blastenkrise befanden. Ausserdem hätten andere Mutationen, die durch diesen Assay nicht detektierbar sind, präsent sein und damit die Ursache für das schnelle Fortschreiten der Krankheit sein können.

Das Auftreten der BCR-ABL Mutation (Glu255Lys) wurde durch den etablierten Assay in der vorliegenden Arbeit bereits vor Behandlungsbeginn mit Imatinib detektiert. Eine 13 monatige Therapie führte bei Patient 3 zu keiner Reduktion der bcr-abl mRNS, so dass man in diesem Falle von einer ineffektiven Therapie ausgehen muss (siehe Abb. 15A-B).

Bei Patient 4 verschwand die anfangs (Woche 0) detektierbare Tyr253His-Mutation nach Therapiebeginn mit Imatinib. Nach sechs Wochen konnte die Mutation im leukozytopenischen Zustand jedoch wieder detektiert werden (siehe Abb. 16A-B).

Die hieraus resultierende Fragestellung ist, wie Patienten mit präexistenten oder sich entwickelnden resistenten Klonen in Zukunft behandelt werden könnten. Verschiedene Ansätze wurden bereits in vitro und/ oder in vivo vorgestellt:

- I. Absetzen der Imatinibtherapie. Für das Unterbrechen einer Behandlung mit Imatinib spricht das Argument, dass man auf diese Weise den Selektionsdruck für mutierte Klone reduziert. Einzelberichte zeigen eine Reduktion des resistenten Klon nach Absetzen der Therapie mit Imatinib [132, 133].
- II. Kombinationen mit anderen antileukämischen Agenzien. Hierzu zählen vor allem die in der Behandlung der CML traditionell genutzten

Chemotherapeutika, wie Interferon α (IFN α), Cytosin-Arabinoside (AraC), Hydroxyurea und Busulfan, aber auch andere Chemotherapeutika, die nicht zur klassischen Therapiemedikation gehören, wie Homoharringtonine (HHT) oder Farnesyltransferase-Inhibitoren.

- III. Verschiedene in vitro-Untersuchungen bezüglich einer Kombination mit Imatinib sind zusammengefasst bei Topaly et al. (2002) zu finden [134]. Dabei wurden neben den klassischen Therapieagentien auch andere untersuchte Chemotherapeutika wie HHT und Farnesyltransferase-Inhibitoren mit antileukämische Wirkung getestet. Trotz teilweise kontroverser Ergebnisse berichten die meisten Autoren von einigen Chemotherapeutika mit synergistischer Wirkung bei gleichzeitiger Gabe von Imatinib, wie im Falle von IFN α und AraC [133, 135, 136, 137]. Auch wenn in vitro Daten nicht immer mit den klinischen Wirkungen korrelieren, können diese Informationen bei der Erstellung von neuen Therapieprotokollen zur Kombinationstherapie bei CML von Bedeutung sein.
- IV. Imatinib Dosiserhöhung
- V. Eine Dosiserhöhung von Imatinib führte bei CML-Patienten in chronischer Phase, die entweder eine zytogenetische Resistenz aufwiesen oder rezidiert waren, in einigen Fällen zum Erfolg [138]. Hierbei ist der limitierende Faktor die Toxizität.
- VI. Entwicklung von Imatinib-ähnlichen Substanzen mit erhöhter Bindungsaffinität.
- VII. Eine Entwicklung von Imatinib-ähnlichen Substanzen mit erhöhter Bindungsaffinität stützt sich auf die Idee, auftretende Punktmutationen an der Bindungsstelle – genau auf Grund ihrer stärkeren Bindungsfähigkeit – überwinden zu können.
- VIII. Autoimmunvakzinierung. Eine Vakzinierung mit Peptiden aus der bcr-abl Fusionsregion kann eine spezifische Immunantwort bei CML Patienten induzieren [139]. Da spezifische T- Zellen bei Patienten in zytogenetischer Remission wie auch gesunden Spendern detektiert werden konnten, vermutet man eine Korrelation zwischen der zytogenetischen Antwort und Detektion von bcr-abl spezifischen T-Zellen [140].

Ein Vergleich der Ergebnisse dieser Studie mit vorangegangenen Arbeiten zeigt, dass Imatinib den bisherigen medikamentösen Therapien bei der CML hinsichtlich der Rate des hämatologischen und zyogenetischen Ansprechens überlegen ist. Komplette hämatologische Ansprechraten bis zu fast 84% in dieser Arbeit und sogar 91% bei Kantarjian et al. (2002) liegen sichtlich höher als bei vergleichbaren Patienten unter Therapie mit IFN α (70-80%) [31, 141, 142]. Ein major-zytogenetisches Ansprechen bei 33% der Patienten in akzelerierter Phase und 24% bei Talpaz et al. (2002) ist ermutigend, weil unter Therapie mit alternativen Mitteln weniger als 5% der CML-Patienten in akzelerierter Phase ein zytogenetisches Ansprechen und demnach ein kürzeres Überleben zeigten [143, 144].

Die Resultate zeigen auch, dass mit Imatinib im Vergleich zu bisherigen medikamentösen Therapien bessere Ergebnisse bei geringerem Nebenwirkungsprofil erzielt werden können.

Bislang gibt es noch keine ausreichenden Langzeitergebnisse bezüglich einer Therapie mit Imatinib, um die Frage des Gesamtüberlebens beantworten zu können. Aufgrund der bekannten Korrelation zwischen zytogenetischem Ansprechen und der Überlebensdauer bei IFN α , könnte jedoch eine Verbesserung des Gesamtüberlebens unter Imatinib erwartet werden.

5.6 AUSBLICK

Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten bestätigen Imatinib als neue Therapieform, mit der hämatologische und zyogenetische Vollremissionen erreicht werden können.

Bei der Diskussion auftretener Resistenzen unter Therapie mit Imatinib ist jedoch zu bemerken, dass die Resistenz momentan allein auf eine Reaktivierung des p210 BCR-ABL zur vollen Stärke zurückzuführen ist. Diese Tatsache unterstreicht die Bedeutung des Fusionsproteins in der Progression der CML und begrenzt damit in gewisser Hinsicht das Problem der Resistenzentwicklung und der Erlangung notwendiger Kontrolle darüber. In Analogie zur Behandlung einer HIV-Erkrankung mit „Medikamenten-Cocktails“, bei dem jedes einzelne Medikament einen anderen Wirkmechanismus aufweist, basiert der Ansatz einer Kombinationstherapie von Imatinib mit anderen medikamentösen Agenzien vor allem auf der Idee, auf diese Weise das Wirkungsspektrum zu erhöhen und dem leukämischen Klon die schlechtesten

Voraussetzungen zu liefern, Resistenzen gegenüber den Medikamenten zu entwickeln. Die Schwierigkeit, mit einem einzelnen Inhibitor alle Mutanten zu kontrollieren, unterstreicht die Bedeutung einer Prävention von Resistenzen bzw. einer Etablierung von Kombinationstherapien, die die Mutationen überwinden können.

Der in dieser Arbeit etablierte PNA-Clamping Assay ermöglichte das Detektieren mutierter leukämischer Klone zu einem sehr frühen Zeitpunkt. Vorstellbar wäre eine Weiterentwicklung dieses Assays zu einem Ansatz einer Multiplex-PCR, die alle bisher bekannten, bei Resistenz gegenüber Imatinib auftretenden Mutationen zu detektieren vermag. Weitere Untersuchungen sollten sich mit einem Vergleich verschiedener Therapiestrategien nach Auftreten von bcr-abl Mutationen beschäftigen.

Neben der Bedeutung für die Behandlungsstrategien stehen aber das Monitoring des Krankheitsverlaufes und das therapeutische Ansprechen im Vordergrund der Behandlung mit Imatinib. Der Nachweis einer „minimalen Resterkrankung“, d.h. ein Vorhandensein leukämischer Zellen bei Patienten in zytogenetischer Remission, hat vor allem zum Ziel, den Zeitpunkt einer Rezidivbehandlung zu optimieren.

Zum Zeitpunkt der IFN α -Therapie war die quantitative Echtzeitfluoreszenz-PCR zur Messung der bcr-abl mRNS noch nicht relevant, da es bei der Mehrzahl der Patienten zu keinem nennenswerten molekularbiologischen Ansprechen kam. Im Falle von Imatinib jedoch ermöglicht nun die quantitative Echtzeitfluoreszenz-PCR durch Messung der bcr-abl mRNS eine rasche Beurteilung der Remissionsqualität und ihrer Dynamik.

Die Aufgabe wird in Zukunft sein, bei Diagnosestellung eine effektive „individuelle Therapieplanung“ aufstellen zu können, basierend auf klinischen Parametern, individuell genetischen Faktoren, wie z.B. dem Medikamentenmetabolismus oder dem genetischen Aufbau der Leukämiezelle, der Zytogenetik und der initialen bcr-abl Last.

Genetische Profile könnten in Zukunft durch Microarrayanalysen erstellt werden [145].

Neue Behandlungsstrategien und ein verbessertes Monitoring prognostischer Faktoren, des Krankheitsverlaufes und des therapeutischen Ansprechens bieten somit neue Chancen, die Therapieergebnisse zu verbessern und daraus resultierend die Überlebenszeit von CML-Patienten zu verlängern.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Chronischen myeloischen Leukämie (CML) handelt es sich um eine Stammzellerkrankung, die molekularbiologisch durch die Translokation t(9;22)(q34;q11) und das daraus resultierende chimäre Ph-Chromosom charakterisiert ist.

Während die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (SZT) bis dato die einzig kurative Therapieoption darstellt, führten bisherige medikamentöse Therapien lediglich zu einer Verlängerung des Gesamtüberlebens.

In den letzten Jahren wurde der bcr-abl spezifische Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib in die Therapie der CML eingeführt, der verglichen mit bisherigen zytostatischen Therapien ein primär deutlich besseres Therapieansprechen erzielt mit einem gleichzeitig günstigerem Nebenwirkungsprofil.

Bislang ist unklar, wie lange die mit Imatinib erzielten Remissionen anhalten bzw. welche Patienten von einer derartigen Therapie profitieren. Mittlerweile wurden verschiedene Mutationen im Bereich der Imatinibbindungsstelle des chimären BCR-ABL Proteins identifiziert, welche offensichtlich zu einer Therapieresistenz führen. Darüber hinaus wird spekuliert, dass eine Überexpression des MDR1 Gens eine Rolle bei der Resistenzentwicklung spielen könnte. Als extrinsischer Resistenzfaktor konnte das AGP Protein identifiziert werden, welches möglicherweise Imatinib in vitro und in vivo bindet.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde bei CML-Patienten, welche Imatinib während einer klinischen Prüfung erhielten, das molekulare Therapieansprechen mittels quantitativer Echtzeitfluoreszenz-PCR für die chimäre bcr-abl mRNS- und Wilms Tumor mRNS-Transkripte durchgeführt. Ferner wurde ein neues hochsensitives Verfahren zum Mutationsnachweis etabliert, welches auf dem Prinzip des PNA-Clamping basiert.

Von den 69 untersuchten Patienten konnten bei 21 Patienten durch die quantitative Echtzeitfluoreszenz-PCR-Technik ein molekulares Rezidiv frühzeitig detektiert werden.

Bei 4 der rezidierten Patienten wurde mit dem PNA-Clamping Assay eine Mutation im Bereich der Imatinib-Bindungsstelle festgestellt. Durch dieses Verfahren konnten exemplarisch drei verschiedene Mutationen gezeigt werden. Bei zwei Patientinnen konnte die Thr315Ile-Mutation einmal acht bzw. eine halbe Woche vor dem klinischen Auftreten einer hämatologischen Resistenz detektiert werden. Ein dritter Patient wies schon vor Beginn der Imatinib-Therapie eine Mutation auf. Diese Präexistenz resultierte in einem fehlenden Therapieansprechen. Bei einer Patientin verschwand die anfangs

(Woche 0) detektierbare Tyr253His-Mutation nach Therapiebeginn mit Imatinib, trat dann aber in der sechsten Woche wieder auf.

Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Expressionsspiegel der MDR1 mRNA bzw. AGP mRNA bzw. dem AGP Serumspiegel und dem Auftreten eines Rezidives konnte hingegen nicht festgestellt werden. Zusammenfassend eignet sich in der Behandlung der CML die quantitative Echtzeitfluoreszenz-PCR für bcr-abl mRNA und WT1 mRNA zur molekularen Verlaufskontrolle, wobei sich für die akzelerierte Phase der CML ein Vorteil für die WT1 mRNA im Verlauf zeigt.

Der entwickelte Clamping-Assay ist in der Lage, therapierelevante Mutationen bei Imatinib behandelten CML-Patienten frühzeitig zu detektieren.

Der hypothetische Zusammenhang zwischen der Expression der MDR1 mRNA bzw. AGP mRNA und einer Resistenz gegenüber Imatinib liess sich in dieser Untersuchung nicht nachweisen.

LITERATUR

- [1] Bennett, J H (1845): Case of hypertrophy of the spleen and liver in which death took place from suppuration of the blood, *Edinburgh Medical and Surgical Journal* 64, pp. 413-423.
- [2] Craigie, D (1845): Case of disease of the spleen in which death took place from suppuration of the blood, *Edinburgh Medical and Surgical Journal* 64, pp. 400-12.
- [3] Virchow, R (1845): Weisses Blut, *Forieps Notizen* 36, pp. 151-6.
- [4] Brincker, H (1982): Population-based age- and sex-specific incidence rates in the main types of leukemia, *Scand J Haematol* 29 [3], pp. 241-9.
- [5] Fialkow, O J; Jacobson, R J and Papayannopoulou, T (1977): Chronic myelocytic leukemia: clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage, *Am J Med* 63, pp. 125-30.
- [6] Bernstein, R (1988): Cytogenetics of chronic myelogenous leukemia, *Semin Hematol* 25 [1], pp. 20-34.
- [7] Kantarjian, H; Dixon, D; Keating, M J; Talpaz, M; Walters, R S; McCreadie, K B and Freireich, E J (1988): Characteristics of accelerated disease in chronic myelogenous leukemia, *Cancer* 61 [7], pp. 1441-6.
- [8] Karanas, A and Silver, R T (1968): Characteristics of the terminal phase of chronic granulocytic leukemia, *Blood* 32, pp. 445-59.
- [9] Nowell, P C and Hungerford, D A (1960): A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia, *Science* 132, p. 1497.
- [10] Rowley, J D (1973): A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining, *Nature* 243, pp. 290-293.
- [11] Kurzrock, R; Kantarjian, H; Shtalrid, M; Gutterman, J U and Talpaz, M (1990): Philadelphia chromosome-negative chronic myelogenous leukemia without breakpoint cluster region rearrangement: a chronic myeloid leukemia with a distinct clinical course, *Blood* 75 [2], pp. 445-52.
- [12] Melo, J V (1996): The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype, *Blood* 88 [7], pp. 2375-84.
- [13] Chisoe, S L; Bodenteich, A; Wang, Y F; Wang, Y P; Burian, D; Clifton, S W; Crabtree, J; Freeman, A; Iyer, K; Jian, L and al. (1995): Sequence and analysis of the human ABL gene, the BCR gene, and regions involved in the Philadelphia chromosomal translocation, *Genomics* 27 [1], pp. 67-82.
- [14] Pane, F; Frigeri, F; Sindona, M; Luciano, L and Ferrara, F (1996): Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction), *Blood* 88 [7], pp. 2410-4.
- [15] Shtivelman, E; Lifshitz, B; Gale, R P and Canaani, E (1985): Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukemia, *Nature* 315 [6020], pp. 550-4.
- [16] Lugo, T G; Pendergast, A M ; Muller, A J and Witte, O N (1990): Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products, *Science* 247 [4946], pp. 1079-82.
- [17] Groffen, J; Stephenson, J R; Heisterkamp, N; Bartram, C R; de Klein, A and Grosveld, G (1984): The human c-abl oncogene in the Philadelphia translocation, *J Cell Physiol Suppl* 3, pp. 179-91.
- [18] ten Hoeve, J; Kaartinen, V; Fioretos, T; Haataja, L; Voncken, J W; Heisterkamp, N and Groffen, J (1994): Cellular interactions of CRKL, and SH2-SH3 adapter protein, *Cancer Res* 54 [10], pp. 2563-7.
- [19] Oda, T; Heaney, C; Hagopian, J R; Okuda, K; Griffin, J D and Druker, B J (1994): Crkl is the major tyrosine-phosphorylated protein in neutrophils from patients with chronic myelogenous leukemia, *J Biol Chem* 269 [37], pp. 22925-8.

- [20] Nichols, G L; Raines, M A; Vera, J C ; Lacomis, L; Tempst, P and Golde, D W (1994): Identificatin of CRKL as the constitutively phosphorylated 39-kD tyrosine phosphoprotein in chronic myelogenous leukemia cells, *Blood* 84 [9], pp. 2912-8.
- [21] Puil, L; Liu, J; Gish, G; Mbamalu, G; Bowtell, D; Pelicci, P G; Arlinghaus, R and Pawson, T (1994): Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway, *EMBO* 13 [4], pp. 764-73.
- [22] Carlesso, N; Frank, D A and Griffin, J D (1996): Tyrosyl phosphorylation and DNA binding activity of signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins in hematopoietic cell lines transformed by Bcr/Abl, *J Exp Med* 183 [3], pp. 811-20.
- [23] Sawyers, C; McLaughlin, J and Witte, O N (1995): Genetic requirement for Ras in the transformation of fibroblasts and hematopoietic cells by the Bcr-Abl oncogene, *J Exp Med* 181 [1], pp. 307-13.
- [24] Skorski, T; Bellacosa, A; Nieborowska-Skorska, M; Majewski, M; Martinez, R; Choi, J K; Trotta, R; Wlodarski, P; Perrotti, D; Chan, T O; Wasik, M A; Tschichlis, P N and Calabretta, B (1997): Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI3k/Akt-dependent pathway, *EMBO* 16 [20], pp. 6151-61.
- [25] Skorski, T; Nieborowska-Skorska, M; Szczylik, C; Kanakaraj, P; Perrotti, D; Zon, G; Gewirtz, A; Perussia, B and Calabretta, B (1995): C-RAF-1 serine/threonine kinase is required in BCR/ABL-dependent and normal hematopoiesis, *Cancer Res* 55 [11], pp. 2275-8.
- [26] Warmuth, M; Danhauser-Riedl, S and Hallek, M (1999): Molecular pathogenesis of chronic myeloid leukemia: implications for new therapeutic strategies, *Ann Hematol* 78 [2], pp. 49-57.
- [27] Salgia, R; Li, J L; Ewaniuk, D S; Pear, W; Pisick, E; Burky, S A; Ernst, T; Sattler, M; Chen, L B and Griffin, J D (1997): BCR/ABL induces multiple abnormalities of cytoskeletal function, *J Clin Invest* 100 [1], pp. 46-57.
- [28] Deininger, M W; Vieira, S; Mendiola, R; Schultheis, B; Goldman, J M and Melo, J V (2000): BCR-ABL tyrosine kinase activity regulates the expression of multiple genes implicated in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia, *Cancer Res* 60 [7], pp. 2049-55.
- [29] Senn, N (1903): Case of splenomedullary leukemia successfully treated by the use of Roentgen rays, *Medical Records of New York* 64, pp. 281-2.
- [30] Hehlmann, R; Heimpel, H; Kolb, H J; Heinze, B; Hochhaus, A; Griesshammer, M; Pralle, H; Queisser, W P; Esser, U; Falge, C and al. (1993): The German CML study, comparison of busulfan vs. hydroxyurea vs. interferon alpha and establishment of prognostic score 1, *Leuk Lymphoma* 11 [Suppl 1], pp. 159-68.
- [31] Talpaz, M; Kantarjian, H; McCredie, K; Keating, M J; Trujillo, JM and Gutterman, J (1987): Clinical Investigation of human alpha interferon in chronic myelogenous leukemia, *Blood* 69 [1280].
- [32] Hehlmann, R; Heimpel, H and Hasford, J (1994): Randomized comparison of interferon-alpha with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia, *Blood* 84, pp. 4064-77.
- [33] Gale, R P; Butturini, A and Reizenstein, P (1991): Autotransplants in leukemia: current state, future progress, *Leuk Res* 15 [9], pp. 781-4.
- [34] Silver, R T; Woolf, S H; Hehlmann, R; Appelbaum, F R; Anderson, J; Bennett, C; Goldman, J M; Guilhot, F; Kantarjian, H M; Lichtin, A E; Talpaz, M and Tura, S (1999): An evidence-based analysis of the effect of busulfan, hydroxyurea, interferon, and allogeneic bone marrow transplantation in treating the chronic phase of chronic myeloid leukemia: developed for the American Society of Hematology, *Blood* 94 [5], pp. 1517-36.
- [35] Gratwohl, A; Hermans, J; Goldman, J M; Arcese, W; Carreras, E; Devergie, A; Frassoni, F; Gahrton, G; Kolb, H J; Niederwieser, D; Ruutu, T; Vernant, J P; de Witte, T and Apperley, J (1998): Risk assessment for patients with chronic myeloid leukaemia before allogeneic blood or marrow transplantation, *Lancet* 352, pp. 1987-92.
- [36] Hasford, J; Pfirrmann, M; Hehlmann, R; Allan, N C; Baccarani, M; Kluin-Nelemans, J C; Alimena, G; Steegmann, J L and Ansari, H (1998): A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group., *J Natl Cancer Inst* 90 [11], pp. 850-8.

- [37] (1998): The Italian Cooperative Study Group on chronic myeloid leukemia. Long-term follow-up of the italian trial of Interferon-alpha versus conventional chemotherapy in chronic myeloid leukemia, *Blood* 92 [5], pp. 1541-1548.
- [38] Lee, L G; Connell, C R and Bloch, W (1993): Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes, *Nucleic Acids Res* 21, pp. 3761-6.
- [39] Wittwer, C T; Ririe, K M; Andrew, R V; David, D A; Gundry, R A and Balis, U J (1997): The Lightcycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control, *Biotechniques* 22 [1], pp. 176-81.
- [40] Wittwer, C T; Herrmann, M G; Moss, A A and Rasmussen, R P (1997): Continuous fluorescences monitoring of rapid cycle DNA amplification, *Biotechniques* 22 [1], pp. 134-8.
- [41] Bernard, P S; Lay, M J and Wittwer, C T (1998): Integrated amplification and detection of the C677T point mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene by fluorescence resonance energy transfer and probe melting curves, *Anal Biochem* 255 [1], pp. 101-7.
- [42] Lay, M J and Wittwer, C T (1997): Real-time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid-cycle PCR, *Clin Chem* 43 [12], pp. 2262-7.
- [43] Santa-Lucia, J Jr; Allawi, H T and Seneviratne, P A (1996): Improved nearest-neighbor parameters for predicting DNA duplex stability, *Biochemistry* 35 [11], pp. 3555-62.
- [44] Kyger, E M; Krevolin, M D and Powell, M J (1998): Detection of the hereditary hemochromatosis gene mutation by real-time fluorescence polymerase chain reaction and peptide nucleic acid clamping, *Anal Biochem* 260 [2], pp. 142-8.
- [45] Thorpe, P H and Porteous, D J (1999): Rapid quantification of gene therapy specific CFTR expression using the amplification refractory mutation system, *Biotechniques* 27 [1], pp. 122-6.
- [46] Nielsen, P E; Egholm, M and Buchardt, O (1994): Peptide nucleic acid (PNA). A DNA mimic with a peptide backbone, *Bioconjug Chem* 5 [1], pp. 3-7.
- [47] Buchardt, O; Egholm, M; Berg, R H and Nielsen, P E (1993): Peptide nucleic acids and their potential applications in biotechnology, *Trends Biotechnol* 11 [9], pp. 384-6.
- [48] Nielsen, P E (1995): DNA analogues with nonphosphodiester backbones, *Annu Rev Biomol Struct* 24, pp. 167-83.
- [49] Orum, H; Nielsen, P E; Egholm, M; Berg, R H; Buchardt, O and Stanley, C (1993): Single base pair mutation analysis by PNA directed PCR clamping, *Nucleic Acids Res* 21, pp. 5332-6.
- [50] Behn, M; Thiede, C; Neubauer, A; Pankow, W and Schuermann, M (2000): Facilitated detection of oncogene mutations from exfoliated tissue material by a PNA-mediated 'enriched PCR' protocol, *J Pathol* 190 [1], pp. 69-75.
- [51] Thiede, C; Bayerdörffer, E; Blasczyk, R; Wittig, B and Neubauer, A (1996): Simple and sensitive detection of mutations in the ras proto-oncogenes using PNA-mediated PCR clamping, *Nucleic Acids Res* 24 [5], pp. 983-4.
- [52] Druker, B J; Tamura, S; Buchdunger, E; Ohno, S; Segal, G M; Fanning, S; Zimmermann, J and Lydon, N B (1996): Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells, *Nature Med* 2 [5], pp. 561-6.
- [53] Druker, B J and Lydon, N B (2000): Lessons learned from the development of an Abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia, *J Clin Invest* 105 [1], pp. 3-7.
- [54] Buchdunger, E; Zimmermann, J; Mett, H; Meyer, T; Müller, M; Regenass, U and Lydon, N B (1998): Selective inhibition of the platelet-derived growth factor signal transduction pathway by a protein-tyrosine kinase inhibitor of the 2-phenylaminopyrimidine class, *Proc Am Assoc* 95 [20], p. 12069.
- [55] Buchdunger, E; Zimmermann, J; Mett, H; Meyer, T; Müller, M; Druker, B J and Lydon, N B (1996): Inhibition of the Abl protein kinase in vitro and in vivo by a 2-Phenylaminopyrimidine Derivate, *Cancer Res* 56, pp. 100-4.
- [56] Gambacorti-Passerini, C; le Coutre, P and Mologni, L (1997): Inhibition of the ABL kinase activity selectively blocks the proliferation of BCR/ABL+ leukemic cells and induces apoptosis, *Blood Cells Mol Dis* 23, pp. 380-94.

- [57] le Coutre, P; Mologni, L; Marchesi, E; Buchdunger, E; Giardini, R; Formelli, F and Gambacorti-Passerini, C (1999): In vivo eradication of human BCR/ABL-positive leukemia cells with an Abl kinase inhibitor, *J Natl Cancer Inst* 91 [2], pp. 163-8.
- [58] Druker, B J; Talpaz, M; Resta, D J; Peng, B; Buchdunger, E; Ford, J M; Lydon, N B; Kantarjian, H; Capdeville, R; Ohno-Jones, S and Sawyers, C L (2001): Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia, *N Engl J Med* 344 [14], pp. 1031-7.
- [59] Druker, B J; Sawyers, C; Kantarjian, H; Resta, D J; Reese, S F; Ford, J M; Capdeville, R and Talpaz, M (2001): Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the philadelphia chromosome, *N Engl J Med* 344 [14], pp. 1038-42.
- [60] Kantarjian, H; Sawyers, C ; Hochhaus, A; Guilhot, F; Schiffer, C; Gambacorti-Passerini, C; Niederwieser, D; Resta, D J; Capdeville, R; Zoellner, U; Talpaz, M; Druker, B J; Goldman, J; O'Brien, S G; Russell, N; Fischer, T; Ottmann, O ; Cony-Makhoul, P; Facon, T; Stone, R; Miller, C ; Tallman, M; Brown, R; Schuster, M; Loughran, T; Gratwohl, A; Mandelli, F; Saglio, G; Lazzarino, M; Russo, D; Baccarani, M; Morra, E and Group, International STI571 CML Study (2002): Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia, *N Engl J Med* 9 [28], pp. 645-52.
- [61] Talpaz, M; Silver, R T; Druker, B J; Goldman, J M; Gambacorti-Passerini, C; Guilhot, F; Schiffer, C A; Fischer, T; Deininger, M W; Lennard, A L; Hochhaus, A; Ottmann, O G; Gratwohl, A; Baccarani, M; Stone, R; Tura, S; Mahon, F X; Fernandes-Reese, S; Gathmann, I; Capdeville, R; Kantarjian, H and Sawyers, C (2002): Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study, *Blood* 99 [6], pp. 1928-37.
- [62] Sawyers, C; Hochhaus, A; Feldman, E; Goldman, J M and Miller, C B (2002): Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study, *Blood* 99 [10], pp. 3530-9.
- [63] O'Brien, S G; Guilhot, F; Larson, R A; Gathmann, I; Baccarani, M; Cervantes, F; Cornelissen, J J; Fischer, T; Hochhaus, A; Hughes, T ; Lechner, C; Nielsen, J L; Rousselot, P; Reiffers, J; Saglio, G; Shepherd, J; Simonsson, B; Gratwohl, A; Goldman, J; Kantarjian, H; Taylor, K; Verhoef, G; Bolton, A E; Capdeville, R; Druker, B J and IRIS, Investigation (2003): Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia, *N Engl J Med* 348 [11], pp. 994-1004.
- [64] le Coutre, P; Tassi, E; Varella-Garcia, M; Barni, R; Mologni, L; Cabrita, G; Marchesi, E; Supino, R and Gambacorti-Passerini, C (2000): Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification, *Blood* 95 [5], pp. 1758-66.
- [65] Mahon, F X; W, Deininger M; Schultheis, B; Chabrol, J; Reiffers, J; Goldman, J M and Melo, J V (2000): Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance, *Blood* 96 [3], pp. 1070-9.
- [66] Weisberg, E and Griffin, J D (2000): Mechanism of resistance to the ABL tyrosine kinase inhibitor STI 571 in BCR/ABL-transformed hematopoietic cell lines, *Blood* 95 [11], pp. 3498-505.
- [67] Gorre, M E; Mohammed, M; Ellwood, K; Hsu, N; R, Paquette; Rao, P N and Sawyers, C (2001): Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification, *Science* 293 [5531], pp. 876-80.
- [68] Hochhaus, A; Kreil, S; Corbin, A; La Rosee, P; Lahaye, T; Berger, U; Cross, N C; Linkesch, W; Druker, B J; Hehlmann, R; Gambacorti-Passerini, C; Corneo, G and D'Incalci, M (2001): Roots of clinical resistance to STI 571 cancer therapy, *Science* 293 [5538], p. 2163.
- [69] Ambudjar, S V; Lelong, I H; Zhang, L and Cardarelli, C (1998): Purification and reconstitution of human P-glycoprotein, *Methods Enzymol* 292, pp. 492-504.
- [70] Ashida, H; Oonishi, T and Uyesaka, N (1998): Kinetic analysis of the mechanism of action of the multidrug transporter, *J Theor Biol* 195 [2], pp. 219-32.
- [71] Cordon-Cardo, C; O'Brien, J P; Boccia, J; Casals, D; Bertino, J R and Melamed, M R (1990): Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues, *J Histochem Cytochem* 38 [9], pp. 1277-87.

- [72] Scarborough, G A (1995): Drug-stimulated ATPase activity of the human P-glycoprotein, *J Bioenerg Biomembr* 27 [1], pp. 37-41.
- [73] Gros, P; Ben Neriah, Y B; Croop, J M and Housman, D E (1986): Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance, *Nature* 323 [6090], pp. 728-31.
- [74] Pastan, I; Gottesman, M M; Ueda, K; Lovelace, E; Rutherford, A V and Willingham, M C (1988): A retrovirus carrying an MDR1 cDNA confers multidrug resistance and polarized expression of P-glycoprotein in MDCK cells, *Proc Natl Acad Sci USA* 85 [12], pp. 4486-90.
- [75] Germann, U A; Willingham, M C; Pastan, I and Gottesman, M M (1990): Expression of the human multidrug transporter in insect cells by a recombinant baculovirus, *Biochemistry* 29 [9], pp. 2295-303.
- [76] Castillo, G; Vera, J C; Yang, C P; Horwitz, S B and Rosen, O M (1990): Functional expression of murine multidrug resistance in *Xenopus laevis* oocytes, *Proc Natl Acad Sci USA* 87 [12], pp. 4737-41.
- [77] Dalton, W S (1997): Detection of multidrug resistance gene expression in multiple myeloma, *Leukemia* 11 [7], pp. 1166-9.
- [78] Leith, C P; Kopecky, K J; Chen, I M; Eijdem, L; Slovak, M L; McConnell, T S; Head, D R; Weick, J; Grever, M R; Appelbaum, F R and Willman, C L (1999): Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study, *Blood* 94 [3], pp. 1086-99.
- [79] List, A F (1996): Role of multidrug resistance and its pharmacological modulation in acute myeloid leukemia, *Leukemia* 10 [6], pp. 937-42.
- [80] Marie, J P; Helou, C; Thevenin, D; Delmer, A and Zittoun, R (1992): In vitro effect of P-glycoprotein (P-gp) modulators on drug sensitivity of leukemic progenitors (CFU-L) in acute myelogenous leukemia (AML), *Exp Hematol* 20 [5], pp. 565-8.
- [81] Willman, C L (1996): Immunophenotyping and cytogenetics in older adults with acute myeloid leukemia: significance of expression of the multidrug resistance gene-1 (MDR1), *Leukemia* 10 [Suppl 1], pp. 33-5.
- [82] Del Poeta, G; Venditti, A; Aronica, G; Stasi, R; Cox, M C; Buccisano, F; Bruno, A; Tamburini, A; Suppo, G; Simone, M D; Epiceno, A M; Del Moro, B; Masi, M; Papa, G and Amadori, S (1997): P-glycoprotein expression in de novo acute myeloid leukemia, *Leuk Lymphoma* 27 [3-4], pp. 257-74.
- [83] Turkina, A G; Baryshnikov, A Y ; Sedyakhina, N P; Folomeshkina, S V; Sokolova, M A; Choroshko, N D and Stavrovosaya, A A (1996): Studies of P-glycoprotein in chronic myelogenous leukaemia patients: expression, activity and correlation with CD34 antigen, *Br J Haematol.* 92 [1], pp. 88-96.
- [84] Maia, R C; Carrico, M K; Klumb, C E; Noronha, H; Coelho, A M; Vasconcelos, F C and Ruimanek, V M (1997): Clinical approach to circumvention of multidrug resistance in refractory leukemic patients: association of cyclosporin A with etoposide, *J Exp Clin Cancer Res* 16 [4], pp. 419-24.
- [85] Kuwazuru, Y; Yoshimura, A; Hanada, S; Ichikawa, M; Saito, T; Uozumi, K; Utsunomiya, A; Arima, T and Akiyama, S (1990): Expression of the multidrug transporter, P-glycoprotein, in chronic myelogenous leukaemia cells in blast crisis, *Br J Haematol.* 74 [1], pp. 24-9.
- [86] Michelutti, A; Michieli, M; Damiani, D; Melli, C; Geromin, A; Russo, D; Fanin, R and Baccarani, M (1994): Overexpression of MDR-related p170 glycoprotein in chronic myeloid leukemia, *Haematologica* 79 [3], pp. 200-4.
- [87] Shah, N P; Nicoll, J M; Nagar, B; Gorre, M E; Paquette, R L; Kuriyan, J and Sawyers, C (2002): Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia, *Cancer Cell* 2 [2], pp. 117-25.

- [88] Branford, S; Rudzki, Z; Walsh, S; Grigg, A; Arthur, C; Taylor, K; Herrmann, R; Lynch, K P and Hughes, T P (2002): High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance, *Blood* 99 [9], pp. 3472-5.
- [89] von Bubnoff, N; Schneller, F; Peschel, C and Duyster, J (2002): BCR-ABL gene mutations in relation to clinical resistance of Philadelphia-chromosome-positive leukemia to STI571: a prospective study, *Lancet* 359, pp. 487-91.
- [90] Roumiantsev, S; Shah, N P; Gorre, M E; Nicoll, J; Brasher, B B; Sawyers, C and Van Etten, R A (2002): Clinical resistance to the kinase inhibitor STI-571 in chronic myeloid leukemia by mutation of Thr-253 in the Abl kinase domain P-loop, *Proc Natl Acad Sci USA* 99 [16], pp. 10700-5.
- [91] Barthe, C; Cony-Makhoul, P; Melo, J V and Mahon, J R (2001): Roots of clinical resistance to STI-571 cancer therapy, *Science* 293 [5538], p. 2163.
- [92] Gambacorti-Passerini, C B; Gunby, R H; Piazza, R; Galletta, A; Rostagno, R and Scapozza, L (2003): Molecular mechanisms of resistance to imatinib in Philadelphia-chromosome-positive leukaemias, *Lancet Oncol* 4 [2], pp. 75-85.
- [93] Roche-Lestienne, C; Soenen-Cornu, V; Grardel-Duflos, N; Lai, J L; Philippe, N; Facon, T; Fenaux, P and Preudhomme, C (2002): Several types of mutations of the Abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI 571, and they can pre-exist to the onset of treatment, *Blood* 100 [3], pp. 1014-8.
- [94] Shah, N P; Nicoll, J M; Gorre, M E; Paquette, R L and Ford, J M (2001): Resistance to Gleevec: Sequence Analysis reveals a spectrum of BCR/ABL kinase domain mutations in both acquired- and de novo- resistant cases of chronic myelogenous leukemia (CML) in myeloid blast crisis, *Blood* 98, p. abs. #3205.
- [95] Launeville, P; Sun, G; Timm, M and Vekemans, M (1992): Clonal evolution in a myeloid cell line transformed to interleukin-3 independent growth by retroviral transduction and expression of p210bcr/abl, *Blood* 80, pp. 1788-1797.
- [96] Gambacorti-Passerini, C; Barni, R; le Coutre, P; Zucchetti, M; Cabrita, G; Cleris, L; Rossi, F; Gianazza, E; Brueggen, J; Cozens, R; Pioltelli, P; Pogliani, E; Corneo, G; Formelli, F and D'Incalci, M (2000): Role of alpha 1 acid glycoprotein in the in vivo resistance of human BCR-ABL(+) leukemic cells to the abl inhibitor STI 571, *J Natl Cancer Inst* 92 [20], pp. 1641-50.
- [97] Kremer, J M; Wilting, J and Janssen, L H (1988): Drug binding to human alpha-1-acid glycoprotein to monitor therapy of cancer patients, *Pharmacol Rev* 40 [1], pp. 1-47.
- [98] Ganz, P A; Shell, W E and Tokes, Z A (1983): Evaluation of a radioimmunoassay for alpha 1-acid glycoprotein to monitor therapy of cancer patients, *J Natl Cancer Inst* 71 [1], pp. 25-30.
- [99] Kreuzer, K-A; Lass, U; Nagel, S; Ellerbrok, H; Pauli, G; Pawlaczyk-Peter, B; Siegert, W; Huhn, D and Schmidt, C A (2000): Applicability of an absolute quantitative procedure to monitor intra-individual bcr/abl transcript kinetics in clinical samples from chronic myelogenous leukemia patients, *Int J Cancer* 86 [5], pp. 741-6.
- [100] Kreuzer, K-A; Lass, U; Landt, O; Nitsche, A; Laser, J; Ellerbrok, H; Pauli, G; Huhn, D and Schmidt, C A (1999): Highly sensitive and specific fluorescence reverse transcription-PCR assay for the pseudogene-free detection of beta-actin transcripts as quantitative reference, *Clin Chem* 45 [2], pp. 297-300.
- [101] King-Underwood, L and Pritchard-Jones, K (1998): Wilms' tumor (WT1) gene mutations occur mainly in acute myeloid leukemia and may confer drug resistance, *Blood* 91 [8], pp. 2961-8.
- [102] Scharnhorst, V; Dekker, P; van der Eb, A J and Jochemsen, A G (1999): Internal translation initiation generates novel WT1 protein isoforms with distinct biological properties, *J Biol Chem* 274 [33], pp. 23456-62.
- [103] Madden, S L; Cook, D M; Morris, J F; Gashler, A; Sukhatme, V P and Rauscher, F J 3rd (1991): Transcriptional repression mediated by the WT1 Wilms tumor gene product, *Science* 253 [5027], pp. 1550-3.
- [104] Wang, W L; Healy, M E; Sattler, M; Verma, S; Lin, J; Maulik, G; Stiles, C D; Griffin, J D; Johnson, B E and Salgia, R (2000): Growth inhibition and modulation of kinase pathways of small cell lung cancer cell lines by the novel tyrosine kinase inhibitor STI 571., *Oncogene* 19 [31], pp. 3521-8.

- [105] Goodyer, P; Dehbi, M; Torban, E; Bruening, W and Pelletier, J (1995): Repression of the retinoic acid receptor-alpha gene by the Wilms' tumor suppressor gene product, wt1, *Oncogene* 10 [6], pp. 1125-9.
- [106] Hewitt, S M; Hamada, S; McDonnell, T J; Rauscher, F J 3rd and Saunders, G F (1995): Regulation of the proto-oncogenes bcl-2 and c-myc by the Wilms' tumor suppressor gene WT1, *Cancer Res* 55 [22], pp. 5386-9.
- [107] Maheswaran, S; Park, S; Bernard, A; Morris, J F; Rauscher, F J 3rd; Hill, D E and Haber, D A (1993): Physical and functional interaction between WT1 and p53 proteins, *Proc Natl Acad Sci USA* 90 [11], pp. 5100-4.
- [108] Baird, P N and Simmons, P J (1997): Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in normal hemapoiesis, *Exp Hematol* 25 [4], pp. 312-20.
- [109] Inoue, K; Ogawa, H; Sonoda, Y; Kimura, T; Sakabe, H; Oka, Y; Miyake, S; Tamaki, H; Oji, Y; Yamagami, T; Tatekawa, T; Soma, T; Kishimoto, T and Sugiyama, H (1997): Aberrant overexpression of the Wilms tumor gene (WT1) in human leukemia, *Blood* 89 [4], pp. 1405-12.
- [110] Inoue, K; Sugiyama, H; Ogawa, H; Nakagawa, M and Yamagami, T (1994): WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia, *Blood* 84 [9], pp. 3071-9.
- [111] Kreuzer, K-A; Saborowski, A; Lupberger, J; Appelt, C; Na, I-K; le Coutre, P and Schmidt, C A (2001): Fluorescent 5'-exonuclease assay for the absolute quantification of Wilms' tumor gene (WT1) mRNA: implications of monitoring human leukaemias, *Br J Haematol.* 114 [2], pp. 313-8.
- [112] le Coutre, P; Kreuzer, K-A; Na, I-K; Lupberger, J; Holdhoff, M; Appelt, C; Schwarz, M; Muller, C; Gambacorti-Passerini, C; Platzbecker, U; Bonnet, R; Ehninger, G and Schmidt, C A (2002): Determination of a-1 acid Glycoprotein in patients with Ph+ chronic myeloid leukemia during the first 13 weeks of therapy with STI571, *Blood Cells Mol Dis* 28 [1], pp. 75-85.
- [113] Brunner, E; Domhof, S and Langer, F (2003): Nonparametrical analysis of longitudinal data in factorial experiments, Wiley, New York.
- [114] Cancer Therapy Evaluation Program. Common Toxicity Criteria 2.0. CDTD, NCI, NIH, DHSS. March 1998. [<http://ctep.info.nih.gov/ctc3.htm>].
- [115] Schwarz, M; Kreuzer, K-A; Baskaynak, G; Dörken, B and le Coutre, P (2002): Imatinib-induced acute generalized exanthematous pustulosis (AGEP) in two patients with chronic myeloid leukemia, *Eur J Haematol* 69, pp. 254-56.
- [116] Parsons, B L and Heflich, R H (1997): Genotypic selection methods for the direct analysis of point mutations, *Mutat Res* 387 [2], pp. 97-121.
- [117] Pourzand, C and Cerutti, P (1993): Genotypic mutation analysis by RFLP/PCR, *Mutat Res* 288 [1], pp. 113-21.
- [118] van Houten, V M (2000): Molecular assays for the diagnosis of minimal residual head-and neck-cancer: methods, reliability, pitfalls, and solutions, *Clin Cancer Res* 6 [10], pp. 3803-16.
- [119] Sotlar, K; Escribano, L; Landt, O; Möhrle, S; Herrero, S; Torrelo, A; Lass, U; Horny, H P and Bultmann, B (2003): One-Step Detection of c-kit Point Mutations Using Peptide Nucleic Acid-Mediated Polymerase Chain Reaction Clamping and Hybridization Probes, *Am J Pathol* 162, pp. 737-746.
- [120] Kharbanda, S; Pandey, P; Yamauchi, T; Kumar, S; Kaneki, M; Kumar, V; Bharti, A; Yuan, Z M; Ghanem, L; Rana, A; Weichselbaum, R; Johnson, G and Kufe, D (2000): Activation of MEDK Kinase 1 by the c-Abl Protein Tyrosine Kinase in Response to DNA Damage, *Molecular and Cellular Biology* 20 [14], pp. 4979-89.
- [121] Buchdunger, E; Cioffi, C L; Law, N; Stover, D; Ohno-Jones, S; Druker, B J and Lydon, N B (2000): Abl protein-tyrosin inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors, *J Pharmacol Exp Ther* 295 [1], pp. 139-45.
- [122] Larghero, J; Mahon, F X and Madeleine-Chambrin, I (2001): Elevated levels of the plasma protein alpha 1 acid glycoprotein in chronic myelogenous leukemia in blast crisis mediate pharmacological resistance to Gleevec (STI571, imatinib) in vitro and are associated with primary resistance in vivo., Presented at the 43rd annual meeting of the American Society of Hematology, Orlando, FL Dec 10.

- [123] le Coutre, P; Kreuzer, K A ; Na, I K ; Schwarz, M; Lupberger, J; Holdhoff, M; Baskaynak, G; Gschaidmeier, H; Platzbecker, U; Ehninger, G; Prejzner, W; Huhn, D and Schmidt, C A (2003): Imatinib in Philadelphia chromosome-positive chronic phase CML patients: Molecular and cytogenetic response rates and prediction of clinical outcome, *Am J Hematol* 73, pp. 249-255.
- [124] Gahmberg, C G and Andersson, L C (1978): Leucocyte surface origin of human alpha1-acid glycoprotein (orosomucoid), *J Exp Med* 148 [2], pp. 507-21.
- [125] Kreuzer, K-A; Lass, U; Bohn, A; Landt, O and Schmidt, C A (1999): Lightcycler technology for the quantitation of bcr/abl fusion transcripts, *Cancer Res* 59, pp. 3171-4.
- [126] Sugiyama, H (1998): Wilms tumor gene (WT1) as a new marker for the detection of minimal residual disease in leukemia, *Leuk Lymphoma* 30 [1-2], pp. 55-61.
- [127] Wang, Z Y; Madden, S L; Deuel, T F and Rascher, F J (1995): The Wilms' tumor gene product, represses transcription of the platelet-derived growth factor A-chain gene, *J Biol Chem* 267, pp. 21999-22002.
- [128] Giles, F J; Kantarjian, H M; Cortes, J; Thomas, D A; Talpaz, M and Manshouri, T (1999): Multidrug resistance protein expression in chronic myeloid leukemia: associations and significance, *Cancer* 86, pp. 805-13.
- [129] Illmer, T; Schaich, M; Platzbecker, U; Freiberg-Richter, J; Oelschlägel, U; von Bonin, M; Pursche, S; Bergemann, T; Ehninger, G and Schleyer, E (2004): P-glycoprotein-mediated drug efflux is a resistance mechanism of chronic myelogenous leukemia cells to treatment with imatinib mesylate, *Leukemia* 18, pp. 401-8.
- [130] Mahon, F X; Belloc, F; Lagarde, V; Chollet, C; Moreau-Gaudry, F; Reiffers, J; Goldman, J M and Melo, J V (2003): MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models, *Blood* 101 [6], pp. 2368-73.
- [131] Dai, H; Marbach, P and Lemaire, M (2003): Distribution of STI-571 to the brain is limited by P-glycoprotein-mediated efflux, *J Pharmacol Exp Ther* 304, pp. 1085-92.
- [132] Müller, M C; Lahaye, T and Hochhaus, A (2002): Resistenz auf tumorspezifische Therapie mit Imatinib durch klonale Selektion mutierter Zellen, *Dtsch Med Wochenschr* 127, pp. 2205-7.
- [133] Tipping, A J; Mahon, F X; Lagarde, V; Goldman, J M and Melo, J V (2001): Restoration of sensitivity to STI571 in STI571-resistant chronic myeloid leukemia cells, *Blood* 98, pp. 3864-67.
- [134] Topaly, J; Zeller, W J and Fruehauf, S (2002): Combination therapy with imatinib mesylate (STI571): Synopsis of in vitro studies, *Br J Haematol* 119, pp. 3-14.
- [135] Kano, Y; Akutsu, M; Tsunoda, S; Mano, H; Sato, Y; Honma, Y and Furukawa, Y (2001): In vitro cytotoxic effects of a tyrosine kinase inhibitor STI571 in combination with commonly used antileukemic agents, *Blood* 97 [7], pp. 1999-2007.
- [136] Thiesing, J T; Ohno-Jones, S; Kolibaba, K S and Druker, B J (2000): Efficacy of STI571, an Abl tyrosine inhibitor, in conjunction with other antileukemic agents against Bcr-abl-positive cells, *Blood* 96 [9], pp. 3195-9.
- [137] Topaly, J; Schad, M; Zeller, W J; Ho, A D and Fruehauf, S (2001b): Strong synergism of different signal transduction inhibitors in chronic myelogenous leukemia, *Blood* 98, p. 617a.
- [138] Kantarjian, H; Talpaz, M; O'Brien, S; Giles, F; Garcia-Manero, G; Faderl, S; Thomas, D; Shan, J; Rios, M B and Cortes, J (2003): Dose escalation of imatinib mesylate can overcome resistance to standard-dose therapy in patients with chronic myelogenous leukemia, *Blood* 101 [2], pp. 473-75.
- [139] Pinilla-Ibarz, J; Cathcart, K; Korontsvit, T; Soignet, S; Boccia, J; Caggiano, J; Lai, L; Jimenez, J; Kolitz, J and Scheinberg, D A (2000): Vaccination of patients with chronic myelogenous leukemia with bcr-abl oncogene breakpoint fusion peptides generates specific immune responses, *Blood* 95, pp. 1781-7.
- [140] Westermann, J; Schlimper, C; Richter, G; Mohm, J; Dörken, B and Pezzuto, A (2004): T-cell recognition of bcr/abl in healthy donors and in patients with chronic myeloid leukemia, *Br J Haematol* 125, pp. 213-6.

- [141] Kantarjian, H; Smith, T L; O'Brien, S; Beran, M; Pierce, S and Talpaz, M (1995): Prolonged survival in chronic myelogenous leukemia after cytogenetic response to interferon-alpha therapy, *Ann Intern Med* 122 [254].
- [142] Talpaz, M; Kantarjian, H; McCredie, K; Trujillo, JM; Keating, JM and Gutterman, J U (1986): Hematologic remission and cytogenetic improvement induced by recombinant human interferon alpha in chronic myelogenous leukemia, *N Engl J Med* 314 [1065].
- [143] Kantarjian, H; Keating, MJ; Estey, EH; O'Brien, S; Pierce, S; Beran, M; Koller, C; Feldman, E and Talpaz, M (1992): Treatment of advanced stages of Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia with interferon-alpha and low-dose cytarabine, *J Clin Oncol* 10 [5], pp. 772-8.
- [144] Kantarjian, H; Talpaz, M; Kontayannis, D; Gutterman, J; Keating, M J; Estey, E H; O'Brien, S; Rios, M B; Beran, M and Deisseroth, A (1992): Treatment of chronic myelogenous leukemia in accelerated and blastic phase with daunorubicin, high-dose cytarabine and granulocyte macrophage colony stimulating factor, *J Clin Oncol* 10, pp. 398-405.
- [145] Tipping, A J; Deininger, M W; Goldman, J M and Melo, J V (2003): Comparative gene expression profile of chronic myeloid leukemia cells innately resistant to imatinib mesylate, *Exp Hematol* 31, pp. 1073-80.

Danksagung

Als erstes danke ich allen Mitarbeitern der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie (Direktor: Prof. Dr. med. Bernd Dörken), die mich im Verlauf meiner Arbeit unterstützten.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Philipp le Coutre und Dr. Karl-Anton Kreuzer für die wissenschaftliche Betreuung und Förderung dieser Arbeit.

Sehr herzlich danken möchte ich auch Herrn Joachim Lupberger, Robert-Koch-Institut, Berlin. Er stand mir jederzeit mit Rat und Tat bei der Planung von Experimenten zur Seite und unterstützte mich bei der Erschließung der molekularbiologischen Daten.

Herrn Prof. Dr. med. Christian-Andreas Schmidt, Universität Greifswald, und Herrn Prof. Dr. Dieter Huhn, emeritiert, möchte ich für die initiale Betreuung dieser Arbeit und Herrn Dr. Gregor Przybylski, Universität Greifswald, für die kompetente Beratung danken.

Bezüglich der Mutationsanalysen möchte ich Herrn Olfert Landt, Herrn Uli Lass und Herrn Dr. Andreas Nitsche von der Firma TIB MOLBIOL für die Zusammenarbeit danken.

Herrn Uwe Lohmann, Cengiz Öztürk und Dr. Ingo Schwaner danke ich für die Einarbeitung und Unterstützung bei meinen ersten Erfahrungen im Umgang mit Zellkulturen und der Durchflusszytometrie.

Frau Jutta Laser, Frau Dipl. biol. Bärbel Pawlaczyk-Peter und Frau Katja Laurisch möchte ich für die Einarbeitung in die molekularbiologischen Laborgrundlagen danken.

Bei Frau Michaela Schwarz, Medizinische Klinik, Charité, Campus Virchow-Klinikum, bedanke ich mich für die Unterstützung im Umgang mit den klinischen Daten und bei Frau Dipl. stat. Tanja Schink, Institut für Medizinische Biometrie, Charité, Humboldt Universität, für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der klinischen Daten.

Besonders danken möchte ich Dipl. biol. Christine Appelt, die mir während meiner ganzen Arbeit mit freundlicher Unterstützung und Anteilnahme beistand.

Frau Hannelore Meyer und Daniela Winck danke ich für das Lesen und die Korrektur dieser Dissertationsschrift.

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeit darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den 05. 11. 2004

Publikationsliste

Manuskripte:

Holdhoff M, Kreuzer KA, Appelt C, Scholz R, Na IK, Hildebrandt B, Riess H, Jordan A, Schmidt CA, van Etten RA, Dörken B, le Coutre P. Radiosensitization of a Human Glioblastoma Cell Line by Imatinib Mesylate Through Inhibition of Platelet-Derived Growth Factor Receptor. Blood Cells Mol Dis. 2005 Mar-Apr; 34(2): 181-5

Na IK, Kreuzer KA, Lupberger J, Dörken B, le Coutre P. Quantitative RT-PCR of Wilms tumor gene transcripts (WT1) for the molecular monitoring of patients with accelerated phase bcr/abl+ CML. Leuk Res. 2005 Mar; 29(3): 343-5

Kreuzer KA*, le Coutre P*, Landt O*, Na IK, Schwarz M, Schultheis K, Hochhaus A, Dörken B. Preexistence and evolution of imatinib mesylate-resistant clones in chronic myelogenous leukemia detected by a PNA-based PCR clamping technique. Ann Hematol. 2003 May; 82(5):284-9. Epub 2003 Apr 12

le Coutre P*, Kreuzer KA*, Na IK, Schwarz M, Lupberger J, Holdhoff M, Baskaynak G, Gschaidmeier H, Platzbecker U, Ehninger G, Prejzner W, Huhn D, Schmidt CA. Imatinib in Philadelphia chromosome-positive chronic phase CML patients: Molecular and cytogenetic response rates and prediction of clinical outcome. Am J Hematol 2003; 73: 249-255

le Coutre P*, Kreuzer KA*, Na IK, Lupberger J, Holdhoff M, Appelt C, Schwarz M, Müller C, Gambacorti-Passerini C, Platzbecker U, Bonnet R, Ehninger G, Schmidt CA. Determination of alpha-1 acid glycoprotein in patients with Ph plus chronic myeloid leukemia during the first 13 weeks of therapy with STI571. Blood Cells Mol Dis 2002; 28: 75-85

Kreuzer KA, Saborowski A, Lupberger J, Appelt C, Na IK, le Coutre P, Schmidt CA. Fluorescent 5'-exonuclease assay for the absolute quantification of Wilms' tumour gene (WT1) mRNA: implications for monitoring human leukaemias. Br J Haematol 2001; 114:313-318

* gleichberechtigte Autoren

Poster:

Honczarek M, Glodek AM, Swierkowski M, Na IK, Silberstein, LE. Developmental stage specific shift in responsiveness to CXCL12 chemokines during B cell development in human bone marrow. Novel role of MIP-3b/CCR7 in early progenitor B cell development. Blood 2003; 102: 162 (45th Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Diego, USA)

Kreuzer KA, le Coutre P, Na IK, Schwarz M, Schultheis K, Landt O, Hochhaus A and Dörken B. Early and sensitive detection of primary and secondary resistance to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukaemia by a novel PNA based PCR clamping assay. Onkologie 2002; 25 (Suppl.4)

Kreuzer KA, le Coutre P, Landt O, Na IK, Schwarz M, Holdhoff M, Laurisch K, Hochhaus A, Dörken B. De novo and acquired resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia as assessed by abl mutations detected through a highly sensitive PNA-clamped hybridization probe assay. Blood 2002; 100: 1232 (44th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Philadelphia, USA)

Holdhoff M, le Coutre P, Kreuzer KA, Appelt C, Jordan R, Scholz R, Na IK, Schwarz M, Lupberger J and Schmidt CA. In vitro effects of the combined administration of Tyrosine Kinase inhibitor STI571 (Imatinib, Glivec) and ionizing radiation on a human glioblastoma cell line: potential use as a radiosensitizer? Strahlenther. Onkol. 2002; 178 (Suppl.1): 48

le Coutre P, Kreuzer KA, Holdhoff M, Appelt C, Jordan A, Scholz R, Schwarz M, Na IK, Lupberger J, Schmidt CA. Effects of the tyrosine kinase inhibitor STI571 and ionizing radiation on a human glioblastoma cell line: Potential use as a radiosensitizer. Blood 2001; 98: 4408 (43rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, Orlando, USA)

Kreuzer KA, le Coutre P, Na IK, Lupberger J, Schwarz M, Holdhoff M, Gschaidmeier H, Schmidt CA. Therapeutic response in 37 chronic phase patients under treatment with STI571 as assessed by hematological and cytogenetic parameters as well as by quantitative real time PCR for bcr-abl mRNA transcripts. Blood 2001; 98: 4774 (43rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, Orlando, USA)

le Coutre P, Kreuzer KA, Lupberger J, Na IK, Holdhoff M, Appelt C, Schwarz M, Müller C, Gambacorti-Passerini C, Platzbecker U, Ehninger G, Schmidt CA. Alpha-1 acid glycoprotein levels in patients with chronic myeloid leukemia during treatment with STI571: Determination of plasma protein and mRNA levels during the first 13 weeks of therapy. Blood 2001; 98: 1304 (43rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, Orlando, USA)

Kreuzer KA, le Coutre P, Na IK, Lupberger J, Appelt C, Saborowski A, Schmidt CA. Wilms Tumor gene (WT1) mRNA quantitation by real time fluorescence RT-PCR is a powerful tool to monitor the disease course of acute myelogenous and lymphatic as well as chronic myelogenous leukemia. Bone Marrow Transpl 2001; 27: S29 (27th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, Maastricht, Netherlands)

Kreuzer KA, le Coutre P, Saborowski A, Lupberger J, Appelt C, Na IK, Bohn A, Schmidt CA. In vitro treatment of chronic myeloid leukemia cells with STI571 leads to an equal reduction of Wilms tumor gene (WT1) and bcr-abl mRNA transcripts. Blood 2000; 96: 423 (42nd Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, USA)